Wirkung und Verteilung von Methotrexat im menschlichen Organismus bei der Leukämiebehandlung

von

Horst Martin

aus Frickenhausen

1965

9099

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen.
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock.

Wirkung und Verteilung von Methotrexat im menschlichen Organismus bei der Leukämiebehandlung.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen.

Vorgelegt von
Horst Martin
aus Frickenhausen.

1965

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. F. Lembeck

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. W. Wilmanns (Prof. Dr. H. E. Boc

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Remmer

Meinen Eltern

in Dankbarkeit zugeeignet.

Herrn Dr. med. W. Wilmanns
danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas,
für die Beratung und
für die kritische Durchsicht
der Arbeit.

G L I E D E R U N G :

Einleitung	Seite 1
Methodik	
I. Materialien	Seite 4
II. Isolierung und Extraktion der Leukocyten	Seite 6
III. Proteinbestimmung	Seite 7
IV. Aktivitätsbestimmungen der FH_2-Reduktase in Leukocytencytolysaten	Seite 7
V. Isolierung von FH_2-Reduktase aus Hühnerleber	Seite 8
VI. Methotrexatbestimmung	Seite 1o
Ergebnisse	Seite 13
I. Dihydrofolsäure - Reduktase in Leukocyten	Seite 27
II. Methotrexat im Serum	Seite 29
III. Methotrexatausscheidung im Urin	Seite 32
IV. Methotrexat in Leukocyten	Seite 33
Diskussion	Seite 35
Zusammenfassung	Seite 4o
Literatur	Seite 42

E I N L E I T U N G :

Folsäureantagonisten werden seit der Beobachtung vorübergehender Remissionen akuter kindlicher Leukämien unter Aminopterin (2,4-Diamino-pteroylglutaminsäure) durch FARBER und Mitarbeiter (19) neben Glucocorticoiden und Purinantagonisten in der Behandlung akuter Leukosen eingesetzt. Klinisch bewährt haben sich das Aminopterin und Amethopterin (2,4-Diamino-1o-methyl-pteroylglutaminsäure), wobei das Amethopterin (Handelsname Methotrexat®) wegen seiner geringeren Toxizität (3o) bevorzugt angewendet wird.

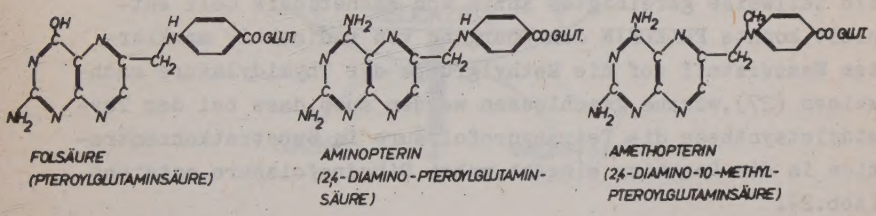

Abb.1: Formeln von Folsäure, Aminopterin und Amethopterin.

Das Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase, welches in myeloischen Leukämiezellen nachgewiesen werden kann (6,1o,65-69), wird durch diese Verbindungen spezifisch gehemmt. Infolge ihrer hohen Affinität zum Enzymprotein, welche 2o ooo mal grösser ist als die der Dihydrofolsäure (63), ist die Hemmung pseudoirreversibel und stöchiometrisch (49,6o,74), d.h. der Enzym-Inhibitor-Komplex ist zwar theoretisch reversibel, infolge der sehr kleinen Dissoziationskonstanten praktisch jedoch irreversibel (1), so dass das Enzym durch den Inhibitor quantitativ titriert werden kann.

Obwohl das Enzym in reifen Leukocyten nicht oder nur in kaum messbaren Aktivitäten gefunden wird, kann eine gesteigerte Aktivität der Dihydrofolsäure-Reduktase nicht als charak-

teristisches Merkmal von Leukämiezellen gewertet werden.WILMANNS fand in normalen Knochenmarkzellen und in Promyelocyten bei Patienten mit Agranulocytosen im akuten Regenerationsstadium keine nennenswerten Aktivitätsunterschiede zu Leukämiezellen (68,7o).

Dihydrofolsäure-Reduktase katalysiert die NADPH^{+})-abhängige Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure:

$$FH_2 + NADPH \rightleftharpoons FH_4 + NADP^{+})$$

Diese wirkt als Cofaktor bei der für Purin-und Thymidylatbiosynthese wichtigen Aktivierung und Übertragung von Einkohlenstoffeinheiten (35,36,38,5o,64-66,68).

In einem Inkubationsansatz,der tritium-markierte Tetrahydrofolsäure,Formaldehyd,Desoxyuridylsäure,$MgCl_2$ und ein teilweise gereinigtes Enzym von Escherichia coli enthielt,konnte FRIEDKIN den Übergang von radioaktiv markiertem Wasserstoff auf die Methylgruppe der Thymidylsäure nachweisen (27),woraus geschlossen werden muss,dass bei der Thymidylatsynthese die Tetrahydrofolsäure in Substratkonzentration in die Reaktion eingeht,wobei Dihydrofolsäure entsteht (Abb.2).

Die Bildung der Thymidylsäure und damit die DNS-Synthese wird durch Amethopterin weitaus stärker gehemmt als die de novo Synthese von Purinen (5,57,59,71).Die cytotoxischen Wirkungen von Amethopterin auf Zellteilungsvorgänge und damit die günstige therapeutische Beeinflussung bestimmter Leukämieformen werden dadurch erklärt.Häufige Komplikationen sind schwere Knochenmarkdepressionen mit Thrombocytopenie,Leukopenie und Anämie,gastrointestinale Ulzerationen, Erliegen der Spermiogenese und Haarausfall.

$^{+}$)Abkürzungen: FH_2 = Dihydrofolsäure
FH_4 = Tetrahydrofolsäure
NADP = Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH = reduziertes NADP
Mtx = Methotrexat

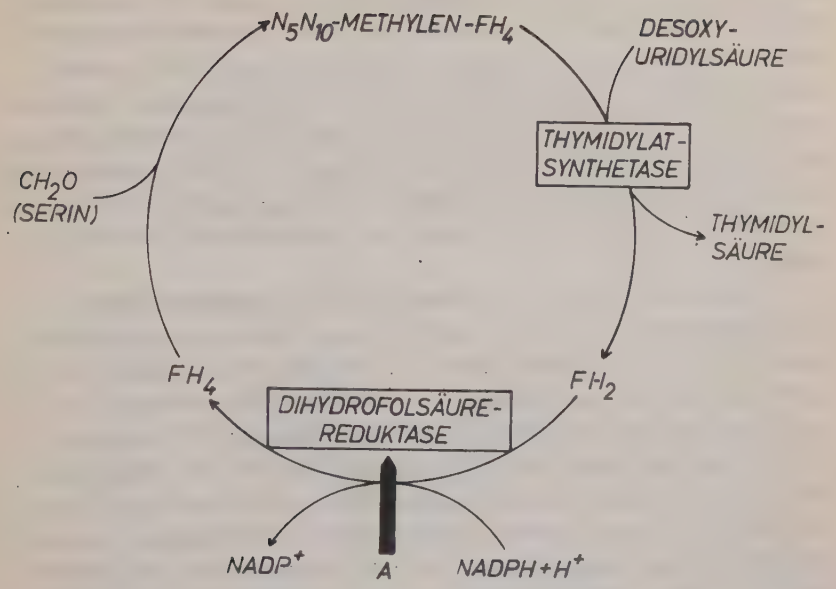

Abb.2: Thymidylatsynthese.Schema nach WILMANNS (38).A = Folsäureantagonisten.

Die Faktoren,die den Erfolg einer Leukämiebehandlung mit Amethopterin bestimmen,sind komplexer Natur.Zu diskutieren sind:

1.) Geringe Zellpermeabilität für Amethopterin.
2.) Unfähigkeit der Zelle,Amethopterin zu retinieren.
3.) Veränderte Affinität des Enzyms zum Antagonisten.
4.) Zu hohe Aktivität des Enzyms in der Zelle.
5.) Fähigkeit der Zelle,das Medikament zu inaktivieren.

Auch bei zunächst erfolgreich behandelten Leukosen entwickelt sich über kurz oder lang eine Therapieresistenz.Ursache - oder wenigstens Indiz - dafür ist eine gegenüber dem Ausgangswert mehrfach erhöhte Aktivität der FH_2-Reduktase,die

von verschiedenen Untersuchern in Bakterien (2,46,47),Zellkulturen (2o,32),Mäuseleukämiestämmen (42) und auch in isolierten menschlichen Leukämiezellen (7-1o) nachgewiesen werden konnte.Es muss sich dabei nicht,wie ursprünglich angenommen wurde,um eine Selektion von Zellen mit hoher Ausgangsaktivität handeln.HAKALA,ZAKRZEWSKI und NICHOL konnten diesen Aktivitätsanstieg unter der Behandlung durch Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit und der FH_2-Reduktase-Aktivität auf eine Mehrproduktion von Enzymprotein zurückführen (32).

Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen ist,die als Ausdruck einer Resistenzentwicklung gedeutete Aktivitätssteigerung der FH_2-Reduktase sowie einen defekten Methotrexattransport in die Zelle zu erfassen,um auf diese Weise im Vergleich mit dem klinischen Krankheitsverlauf Erfolg oder Misserfolg einer Therapie mit Methotrexat schnell beurteilen und danach eine gezielte Therapie gestalten zu können.Neben der Methotrexatkonzentration in Leukocyten wurden Serumspiegel und die Ausscheidung des Medikaments im Urin kontrolliert.

M E T H O D I K :

I. Materialien:

F o l s ä u r e wurde von der Deutschen Hoffmann - La Roche AG in Grenzach, N A D P H (Natriumsalz) von der Firma Boehringer & Soehne GmbH in Mannheim, D o w e x - 1 - Cl vom Serva-Entwicklungslabor in Heidelberg bezogen.M e t h o t r e x a t wurde uns freundlicherweise in ausreichender Menge von der Firma Lederle,Pearl River,N.Y.(USA) zur Verfügung gestellt.

Darstellung von D i h y d r o f o l s ä u r e :Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine von FUTTERMAN angegebene (28) und von BLAKLEY (11) modifizierte Methode durch Reduktion von Folsäure.

1 g Ascorbinsäure wird unter Rühren auf einem Magnetrührer in ca. 4 ml Aqua bidest. in einem 25 ml Kolben gelöst.Unter fort-

laufender Messung des pH mit einer Glaselektrode wird 1 n NaOH langsam bis zur Erreichung eines pH von 6,o zugefügt.Aqua bidest. ad 1o ml.

38,2 mg Folsäure werden in 1,6 ml o,1 n NaOH gelöst und der Natriumascorbatlösung zugesetzt.Die Reduktion erfolgt durch Zugabe von 4oo mg Natriumdithionit.Nach vollständiger Lösung des Natriumdithionits wird langsam für 5 Minuten bei Zimmertemperatur (22 - 25°C) gerührt,dann unter Rühren im Eisbad auf eine Tempera-

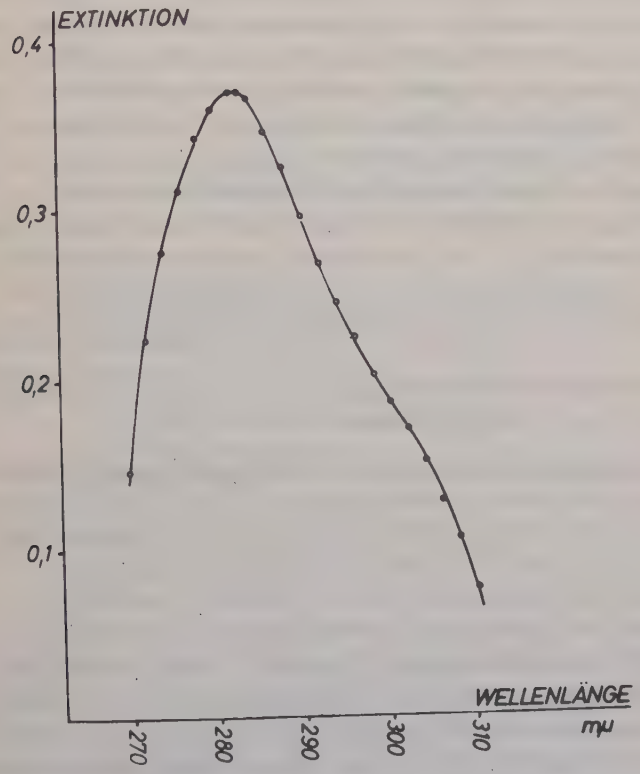

Abb.3: Absorbtionsspektrum der FH_2.

tur unter 5°C abgekühlt.

Die folgenden Schritte werden im Eisbad ausgeführt. Aus einer Bürette wird 1 n HCl bis zu einem pH von 2,8 zugetropft (5 min Rühren). Die Fällung wird in der Servall - Kühlzentrifuge mit SS - 34 Rotor abzentrifugiert (5 min bei 1 ooo g, 0°C). Der Überstand wird verworfen, der vorwiegend amorphe Niederschlag wird in 1o ml 1o%iger Natriumascorbatlösung resuspendiert. Durch vorsichtiges Zufügen von 1 n NaOH wird ein pH von 6,o eingestellt (5 min Rühren). Durch langsames Zutropfen von 1 n HCl wird die Dihydrofolsäure auskristallisiert. Nach vollständiger Kristallisation (5 min nach Erreichen eines pH von 2,8) wird zentrifugiert (5 min bei 1 ooo g, 0°C), der Niederschlag dreimal in ca. 1o ml o,oo5 n HCl von 0°C gewaschen und jeweils wie oben abzentrifugiert.

Die fertige Dihydrofolsäure wird in 4 ml o,oo5 n HCl als Suspension bei 0°C im Dunkeln aufbewahrt.

In o,o1 n KOH gelöst wurde für die Dihydrofolsäure in Übereinstimmung mit FUTTERMAN und BLAKLEY im UV - Licht ein Absorbtionsmaximum bei λ = 283 mμ gefunden (Abb.3). Der Gehalt der Suspension an Dihydrofolsäure kann aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von 22 ooo bei der angegebenen Wellenlänge errechnet werden.

Für Enzymaktivitätsbestimmungen wird die Dihydrofolsäure-Suspension in o,o5 M $KHCO_3$ aufgenommen und verdünnt.

II. Isolierung und Extraktion der Leukocyten nach WILMANNS (65): 2o - 4o ml venösen Blutes werden nach Verdünnung mit 5%iger Mg - Titriplex II - Lösung im Verhältnis 1:1o in silikonisierten Gläsern 3o Minuten bei 37°C inkubiert. Die Leukocytenmanschette wird mit einer silikonisierten Pipette sorgfältig abgehebert, in Zellulosenitrat - Zentrifugenbecher übertragen und 5 Minuten in der Servall - Kühlzentrifuge bei 15o g und 0°C zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsgänge werden bei Temperaturen zwischen 0 und 3°C ausgeführt. Im Sediment noch enthaltene Erythrocytenverunreinigungen werden durch Hämolyse mit o,83%iger Ammoniumchloridlösung in maximal 3 Minuten entfernt. Das Sediment nach Zentrifugation bei 1 ooo g und 0°C wird dreimal in calciumfreier Ringerphosphatglucoselösung gewaschen und jeweils wie oben abzentrifugiert. Die letzte Suspensi-

on wird auf eine Konzentration von ca. 10^8 Zellen pro ml eingestellt.Nach erneuter Zentrifugation wird das Sediment in o,oo1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen und 6o Minuten bei $0^{\circ}C$ stehengelassen.Die nach Cytolyse sedimentierten Zellstromata werden abzentrifugiert (3o min bei 3o ooo g,$0^{\circ}C$).Der Überstand wird für Enzymaktivitätsbestimmungen verwendet.

III. Proteinbestimmung nach BÜCHER (12): Die Eiweisskonzentrationen werden nephelometrisch bestimmt.Trichloressigsäure erzeugt in Lösungen einer bestimmten Salzkonzentration haltbare Trübungen,die der Eiweisskonzentration proportional sind.Die entsprechend verdünnte Proteinlösung wird mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt und mit 2 ml Bücher - Lösung (1 Teil 1 M Trichloressigsäure auf 2 Teile 1%iger Ammoniumsulfatlösung) sorgfältig vermischt. Nach 2o Minuten wird im Zeiss - Spektralphotometer PMQ II bei λ = 54o mμ gegen eine auf gleiche Weise erzeugte Trübung bekannter Mengen von Humanalbumin "reinst" (Behringwerke AG,Marburg/Lahn) gemessen.Die Eichkurve verläuft linear zwischen 5o und 2oo μg Protein im Inkubationsansatz.

IV. Aktivitätsbestimmungen der FH_2-Reduktase in Leukocytencytolysaten nach WILMANNS (66): In Testcuvetten (d = 1 cm) sind in einem Volumen von 2 ml enthalten:

15o μMol Natriumcitratpuffer pH 5,4
15 μMol Mercaptoäthanol
o,5 μMol NADPH
o,1 μMol Dihydrofolsäure
Leukocytencytolysat von 1 - 5 x 10^7 Zellen
Aqua bidest. ad 2 ml.

Im Zeiss - Spektralphotometer PMQ II wird die durch NADPH-Abnahme und Bildung von Tetrahydrofolsäure bedingte Extinktionsabnahme bei λ = 34o mμ im Verlauf von 15 Minuten gegen einen Kontrollwert ohne Dihydrofolsäure bestimmt und durch einen Leerwert ohne Enzym korrigiert.Die spezifische Aktivität wird in μMol Substratumsatz/min/10^{10} Zellen angegeben und auf Grund der molaren Extinktion von 11 2oo bei der angegebenen Wellenlänge berechnet. Die molare Extinktion errechnet sich aus einem Extinktionsabfall

durch Oxydation von NADPH ($\Delta\varepsilon$ = 6 2oo) und Reduktion von Dihydrofolsäure ($\Delta\varepsilon$ = 5 ooo)(42).

V. Anreicherung von FH_2-Reduktase aus Hühnerleber in Anlehnung an ZAKRZEWSKI (73): Tiefgefrorene Hühnerleber wird aufgetaut und mit dem gleichen Gewicht an o,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,6 bei 2°C in einem Elektrostar - Gerät (Star - Mix) 1 Minute homogenisiert. Zellstromata werden in der Servall - Kühlzentrifuge bei 0°C hochtourig abzentrifugiert (2o min bei 3o ooo g). Dem Überstand wird das neunfache Volumen an Azeton von -3o°C langsam unter Rühren auf einem Magnetrührer zugefügt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Azeton von -3o°C gewaschen und über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet. Der getrocknete Filterrückstand wird durch ein feinmaschiges Sieb gerieben, das feingeriebene Azetonpulver in Aqua bidest. (87 mg/ml) eine Stunde auf einem Magnetrührer bei 0 - 4°C gerührt. Unlösliche Anteile werden durch Zentrifugation beseitigt (2o min bei 3o ooo g, 0°C). Der klare, tiefbraune Azetonpulverextrakt wird zur Reinigung und Anreicherung des Enzyms verwendet.

Reinigung des Enzyms: Der wässrige Azetonpulverextrakt wird mit o,5 n NaOH auf pH 8,o eingestellt und mit Dowex - 1 -Cl (2o g/1oo ml) bei 2°C für 3o Minuten mechanisch gerührt, um unerwünschte Cofaktoren zu beseitigen. Der Austauscher wird bei 0°C abzentrifugiert.

Die folgenden Fraktionierungsschritte werden bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C ausgeführt. Dem Überstand wird o,5 n HCl bis zu einem pH von 5,5 zugefügt. Das ausgefallene Protein wird abzentrifugiert (1o min bei 3o ooo g) und verworfen. Der Überstand wird mit o,5 n NaOH neutralisiert. Eine weitere isoelektrische Proteinfällung erfolgt bei pH 4,5. Der Niederschlag wird wie oben abzentrifugiert und verworfen, der Überstand mit o,5 n NaOH neutralisiert. Dem Überstand wird unter Rühren langsam Azeton von -3o°C bis zu einem Azetongehalt von 4o% zugefügt. Das denaturierte Protein wird bei -8°C in Metallzentrifugenbechern abzentrifugiert (1o min bei 3o ooo g) und verworfen. Dem Überstand wird weiter Azeton bis zu einem Gehalt von 6o% zugegeben. Der Niederschlag wird wie oben abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Fraktion zwischen

4o% und 6o% Azeton enthält nach ZAKRZEWSKI nahezu die gesamte Aktivität des Enzyms. Das Präzipitat wird mit Azeton von -3o°C gewaschen, abzentrifugiert und auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur getrocknet. Mit einem Pistill pulverisiert wird es in Eiswasser gelöst. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation beseitigt.

Der wässrige Enzymextrakt wird eingefroren nahezu ohne Wirkungsverlust über Monate aufbewahrt.

In den einzelnen Enzymfraktionen wird die spezifische Aktivität der FH_2-Reduktase gemessen (Tab.I). Durch das angeführte Anreicherungsverfahren wurde vom Leberhomogenat ausgehend ein 18 facher Aktivitätsanstieg der FH_2-Reduktase erreicht.

Tabelle I.

Spezifische Aktivitäten der FH_2-Reduktase in den aus Hühnerleber angereicherten Enzymfraktionen:

Enzymfraktion	Spezifische Aktivität der FH_2-Reduktase (mµMol/min/mg Protein).
Leberhomogenat	o,84
Azetonpulverextrakt	2,o6
Dowex - Überstand	3,61
pH 5,5 - Fraktion	5,24
pH 4,5 - Fraktion	7,76
Enzym	15,oo

Die Inkubationsansätze enthalten in einem Volumen von 2 ml: 15o µMol Natriumcitratpuffer pH 5,9; 15 µMol Mercaptoäthanol; o,5 µMol NADPH; o,1 µMol FH_2 und o,o3 ml Enzymlösung.

Untersucht man die Aktivität der aus Hühnerleber angereicherten FH_2-Reduktase in Abhängigkeit vom pH, so findet man einen hohen Gipfel bei pH 5,8 und einen flacheren Gipfel bei pH 7,5 (Abb.4). Dagegen findet man in Leukocytencytolysaten das Aktivitätsmaximum der FH_2-Reduktase bei pH 5,4 (7o).

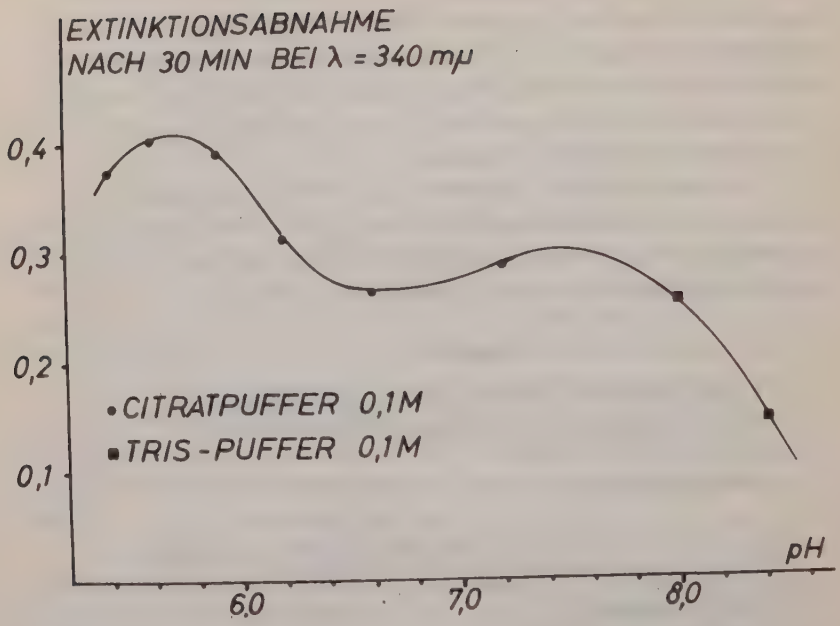

Abb.4: Aktivität der FH_2-Redüktase aus Hühnerleber in Abhängigkeit vom pH.
Inkubationsansatz siehe Legende zu Tab.I.

VI. Methotrexatbestimmung: Methotrexatkonzentrationen im biologischen Material können nach BURCHENAL und Mitarbeiter unter Verwendung eines mikrobiologischen Tests mit Streptococcus faecalis als Testorganismus (14),oder nach FREEMAN durch eine fluorometrische Methode (25,26) bestimmt werden.Die empfindlichste Bestimmungsmethode für Methotrexat beruht nach WERKHEISER,ZAKRZEWSKI und NICHOL auf der spezifischen Hemmung der FH_2-Reduktase durch Folsäureantagonisten (62).

Wird Methotrexat den Inkubationsansätzen zugegeben,so nimmt- entsprechend der stöchiometrischen Bindung des Antagonisten an das Enzymprotein - der Substratumsatz mit steigender Methotrexatkonzen-

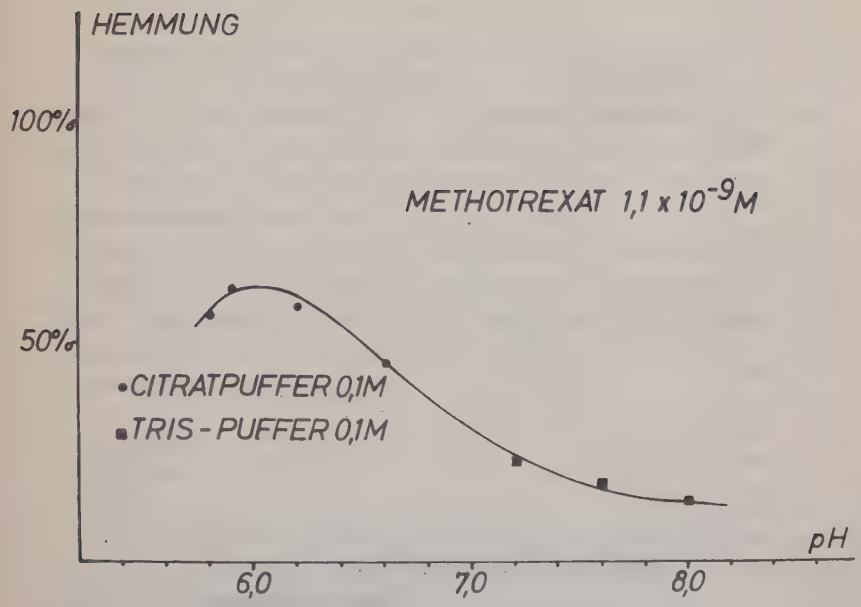

Abb.5: Hemmung der FH_2-Reduktase in Abhängigkeit vom pH. Im Inkubationsansatz (2 ml) sind enthalten:75 µMol Puffer; 15 µMol Mercaptoäthanol;o,5 µMol NADPH;o,1 µMol FH_2;o,o2 ml gereinigtes Hühnerleberenzym;2,2 x 10^{-6} µMol Mtx.

tration linear ab (Abb.6).Zur Titration des Methotrexats wurde aus Hühnerleber angereicherte FH_2-Reduktase verwendet,welche bei pH 5,9 maximal gehemmt wird (Abb.5).

1.) Methotrexat im Serum: Serum (o,o1 - o,25 ml) wird direkt in den Inkubationsansätzen verwendet.Es ist zu erwarten,dass auch das an Serumproteine gebundene Methotrexat infolge der hohen Affinität zum Enzymprotein der FH_2-Reduktase bei der Bestimmung erfasst wird.

2.) Methotrexat im Urin: Die Methotrexatkonzentration wird im 24 - Stunden - Sammelurin bestimmt.Zellige und kristalline Be-

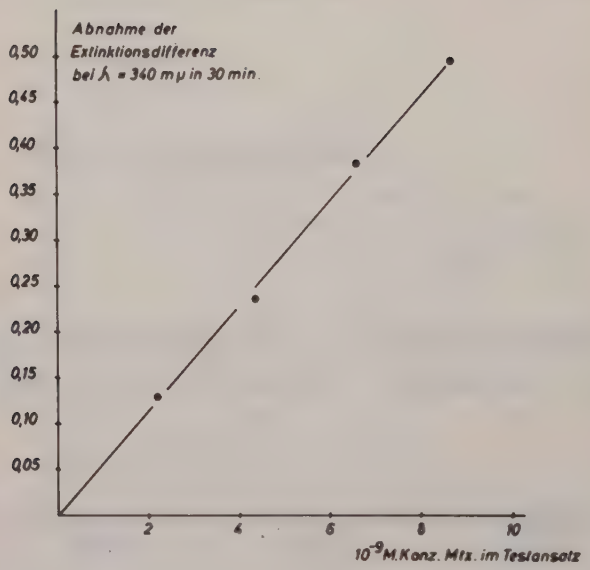

Abb.6: Methotrexat - Eichkurve.
Die Inkubationsansätze (2 ml) enthalten: 75 µMol Natriumcitratpuffer pH 5,9;15 µMol Mercaptoäthanol;Methotrexat nach angegebener Konzentration; 3,75 x $1o^{-3}$ AE+) gereinigtes Hühnerleberenzym. Nach Präinkubation von 1o min bei Zimmertemperatur wird durch Zugabe von o,1 µMol FH_2 und o,5 µMol NADPH die enzymatische Reaktion in Gang gesetzt und im Zeiss-Photometer bei λ = 34o mμ über 15 Minuten verfolgt.

+) 1 AE (Aktivitätseinheit) entspricht der Enzymmenge,die in 1 min 1 µMol Substrat umsetzt.

standteile werden durch Zentrifugation beseitigt;der klare Urin (o,oo1 - o,1 ml) wird unmittelbar bei den Inkubationen eingesetzt.

3.) Methotrexat in Leukocyten: 1,5 - 2,o ml Leukocytencytolysat (Herstellung siehe Seite 6) werden mit o,5 ml 15%iger Trichloressigsäure enteiweisst,das ausgefallene Protein wird abzentrifugiert.Der Überstand,der das abdissoziierte Methotrexat enthält,wird mit 1 M Trisoxymethylaminomethan auf einen pH von 5,5 - 6,5 gebracht und bei der Methotrexatbestimmung verwendet.Der Methotrexatgehalt wird auf $1o^{1o}$ Zellen berechnet.

4.) Methotrexat in Leber und Milz: 1o g Leber oder Milz werden mit 4o ml 15%iger Trichloressigsäure homogenisiert.Im Überstand nach Zentrifugation (1o min bei 3o ooo g) wird nach Einstellung eines pH von 5,5 - 6,5 mit Trisoxymethylaminomethan der Methotrexatgehalt bestimmt.

E R G E B N I S S E :

In Übereinstimmung mit CONDIT (16) und BERTINO (9,1o) bevorzugten wir die intravenöse Verabreichung von Methotrexat in relativ hohen Dosen.Zwischen den einzelnen Injektionen betrugen die Intervalle in Abhängigkeit von den hämatologischen Befunden und von dem Methotrexatgehalt der leukämischen Zellen 5 bis 8 Tage.CONDIT gibt bei einer Dosierung von 1 - 5 mg/kg Körpergewicht Intervalle von 2 - 4 Wochen an.

Die Aktivität der FH_2-Reduktase wurde vor,3o Minuten, 2,4 und 24 Stunden nach der Injektion in den Leukocyten gemessen und in den nächsten Tagen weiter verfolgt.In gleichen zeitlichen Abständen wurde die Methotrexatkonzentration in den Leukocyten und der Serumspiegel an Methotrexat bestimmt;die Methotrexatausscheidung im Urin wurde kontrolliert. Neben diesen biochemischen Befunden sind im folgenden Anamnese und hämatologischer Verlauf bei 7 mit Methotrexat behandelten Patienten wiedergegeben:

1.) Schwei. ♂ (5o J.).

Diagnose: Akuter Myeloblastenschub bei seit 2 Jahren bekannter chronischen Myelose.

Bisherige Therapie: Vorübergehend Röntgenbestrahlung und Behandlung mit Myleran ®, zuletzt mit 2 x 2 mg täglich.

Aufnahmebefund (7.1.1964): Generalisierte Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie und ausgedehnte leukämische Hautinfiltrate. Blutbild: Leukocytose von 27o ooo/mm^3, davon 65% unreife Vorstufen, überwiegend Paramyeloblasten. Hb 7,o g%, Ery 2,9 Mill./mm^3. Thrombocyten 1oo ooo/mm^3. Keine hämorrhagische Diathese. Sternalmark: 256 ooo kernhaltige Zellen, davon 5o% atypische Paramyeloblasten von monocytoidem Charakter.

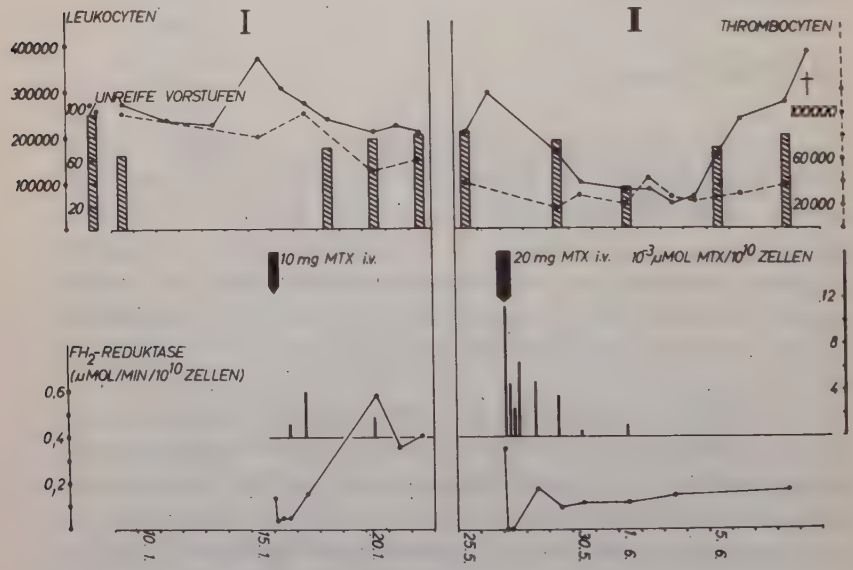

Abb.7: Biochemische Befunde und hämatologischer Verlauf unter der Methotrexatbehandlung bei Schwei. ♂ (5o J.).

Therapie und Verlauf: Gehäufte Bluttransfusionen.

Am 16.1. erste Injektion von 1o mg Methotrexat i.v.Es kam zu einem Abfall der Leukocyten von 3oo ooo auf 2oo ooo pro mm^3 und der Thrombocyten von 8o ooo auf 5o ooo/mm^3.

Nach der Methotrexat - Injektion fiel die Aktivität der FH_2-Reduktase von o,14 auf minimal o,o4 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen ab (Abb.7).Nach 24 Stunden war die Aktivität des Enzyms trotz therapeutisch wirksamer Methotrexatkonzentration in den Leukocyten (4,o x $1o^{-3}$ µMol/$1o^{1o}$ Zellen) auf den Ausgangswert angestiegen,nach 4 Tagen betrug sie das vierfache der ursprünglichen Aktivität.Diese bereits 24 Stunden nach der Injektion nachweisbare Induktion zur Enzymmehrproduktion unter der Methotrexatbehandlung in Verbindung mit dem im wesentlichen unbeeinflussten klinischen Bild wurde im Sinne einer Therapieresistenz gedeutet.

Unter Behandlung mit Purinethol ® zwischenzeitlich kurz anhaltende Besserung.

Am 27.5. zweite Methotrexat - Injektion von 2o mg i.v. bei neuem Myeloblastenschub.Abfall der Leukocyten von 3oo ooo auf 5o ooo/mm^3 und der unreifen Vorstufen von 84% auf 36% innerhalb von 5 Tagen.Keine hämorrhagische Diathese.Abnahme der Milzgrösse um ca. 1o cm.Starke Einschmelzung von leukämischen Hautinfiltraten.

Dem massiven Zellzerfall ging ein Anstieg der Harnsäure im Serum von 15 mg% vor Injektion auf maximal 46 mg% am 5. Tag nach der Injektion parallel.Durch den hohen Harnsäureanfall kam es vorübergehend zu einer Anurie mit erheblicher Retention harnpflichtiger Substanzen (Harnstoff 342 mg%, Kreatinin 4,5 mg%) und einer Hyperkaliämie von 8,o mVal/L. Unmittelbar vor dem Tod kam es zu einem neuen Myeloblastenschub.

Vor der zweiten Injektion war die Aktivität der FH_2-Reduktase in den leukämischen Zellen mit o,35 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen erheblich gesteigert.Schon 3o Minuten nach der Injektion konnte kein Dihydrofolsäureumsatz mehr in den Zellen gemessen werden; das Enzym war vollständig gehemmt.24

Stunden nach der Injektion und in den folgenden Tagen stieg die Aktivität geringfügig an,blieb jedoch unterhalb der Ausgangsaktivität.Methotrexat wurde 3o Minuten nach der Injektion in den Leukocyten in hoher Konzentration ($11,3 \times 10^{-3}$ µMol/10^{10} Zellen) gefunden.In den folgenden Stunden fiel der Methotrexatgehalt in den Zellen etwa auf die Hälfte ab,war aber noch nach 7 Tagen in einer Konzentration von $1,1 \times 10^{-3}$ µMol/10^{10} Zellen nachweisbar.

2.) Grü. ♀ (48 J.).

Diagnose: Akuter Myeloblastenschub bei seit 7 Jahren bekannter chronischen Myelose.

Bisherige Therapie: Über längere Zeit Myleran und zwischenzeitlich zusätzlich Dexamethason.

Aufnahmebefund (8.3.64): Leber 3 Qf,Milz 2o cm unter dem Rippenbogen.Blutbild: 1o 2oo Leukocyten pro mm^3,davon 5o% unreife Vorstufen,5,5% Basophile;kein Hiatus leukaemicus.Hb 7,5 g%,2,8 Mill. Ery pro mm^3.Thrombocyten 78 ooo/mm^3.Keine hämorrhagische Diathese.Sternalmark: 22 ooo kernhaltige Zellen,davon 29% Myeloblasten.

Therapie und Verlauf: Unter Bluttransfusionen und Prednisolon keine Beeinflussung des Blutbildes.Mitte April akuter Myeloblastenschub mit Anstieg der atypischen Paramyeloblasten im Differentialblutbild auf 6o%.

Injektion von 2o mg Methotrexat i.v. am 22.4. Nach der Injektion stiegen die unreifen Blutzellen in der Peripherie noch weiter an (Abb.8).

Die vor Beginn der Methotrexatbehandlung erheblich gesteigerte Aktivität der FH_2-Reduktase (o,22 µMol/min/10^{10} Zellen) fiel nach der Injektion von 2o mg Methotrexat rasch ab.Nach 4 Stunden und am folgenden Tag war das Enzym vollständig gehemmt.Da trotz der fortdauernden Paramyeloblastenausschwemmung in die Peripherie nach 6 Tagen keine wesentliche Enzyminduktion in den Zellen nachzuweisen war,wurde bei abgefallener Konzentration des Medikaments in den Leukocyten ($1,8 \times 10^{-3}$ µMol/10^{10} Zellen) die Methotrexat - Injek-

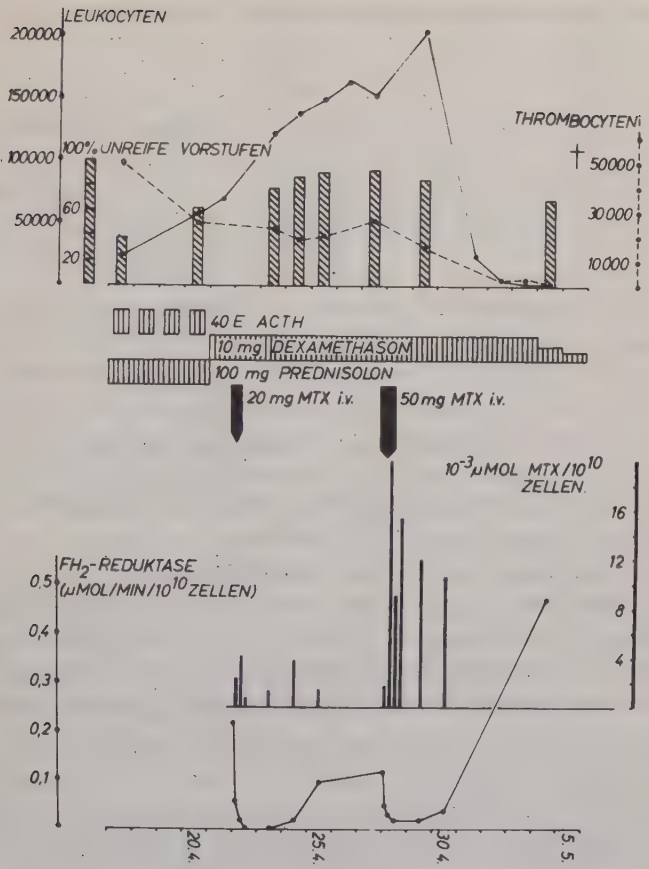

Abb.8: Biochemische Befunde und hämatologischer Verlauf unter der Methotrexatbehandlung bei Grü. o (48 J.).

tion in höherer Dosierung (5o mg i.v.) wiederholt.

Massiver Leukocytensturz von 17o ooo auf 5 ooo/mm^3 innerhalb von 4 Tagen und der Thrombocyten von 5o ooo auf 1 2oo/mm^3.Bedrohliche hämorrhagische Diathese.Soorbeläge im Rachen.Anstieg der Harnsäure im Serum bis auf 34,5 mg%.Nie-

renversagen mit Retention harnpflichtiger Substanzen (Harnstoff 472 mg%,Kreatinin 4,4 mg%).Hyperkaliämie von 6,o mVal/L. Die Pat. starb am 5.5.

Die zweite Methotrexat - Injektion führte bei einem massiven Methotrexateinstrom in die Zellen (Konzentrationsmaximum nach 3o Minuten: 2o x $1o^{-3}$ uMol/$1o^{1o}$ Zellen) und einer langdauernden Retention des Medikamentes in hoher Konzentration zu einer langanhaltenden Depression der Enzymaktivität auf kaum messbare Werte.Bei einer stark abgefallenen Leukocytenzahl kam es durch Selektion resistenter Zellen zu einem Anstieg der Enzymaktivität auf o,47 uMol/min/$1o^{1o}$ Zellen nach 7 Tagen.

3.) Bart. o (63 J.).

Diagnose: Subakut verlaufende Lymphadenose.

Bisherige Therapie: Kombinierte Prednison - Leukeran® -, später Prednison - Endoxan® - Behandlung.

Aufnahmebefund (2o.7.1964): Generalisierte Lymphknotenschwellungen,Leber 3 Qf,Milz ins kleine Becken reichend.Blutbild: Leukocyten 614 ooo/mm^3.Hb 9,7 g%,Ery 2,6 Mill./mm^3.Thrombocyten 5o ooo/mm^3.Sternalmark: Etwa 4 Mill. kernhaltige Zellen mit Vorherrschen von Lymphocyten und lymphoidzelligen Paramyeloblasten.

Therapie und Verlauf: Prednison - und Endoxanbehandlung blieben erfolglos.

Am 13.8. Injektion von 1o mg Methotrexat i.v. Die Leukocyten bewegten sich unverändert zwischen 4oo ooo und 6oo ooo/mm^3,die Thrombocyten schwankten um 8o ooo/mm^3.

Vor der Methotrexat - Injektion konnte in den Leukocyten bei mehrfachen Kontrollen keine Aktivität der FH_2-Reduktase gemessen werden.Ein Aktivitätsanstieg durch Enzyminduktion war nach der Injektion von 1o mg Methotrexat insofern nicht zu erwarten,als das Medikament nicht oder nur in nicht nachweisbarer Konzentration in die Zellen gelangte.Die Therapieresistenz ist auf diese Impermeabilität zurückzuführen.

4.) Her. ♂ (15 J.).

Diagnose: Akute lymphoidzellige Paramyeloblastenleukämie.

Aufnahmebefund (11.6.1964): Bedrohliche hämorrhagische Diathese.Vereinzelt palpable Lymphknoten.Leber 3 Qf,Milz 2 cm unter dem Rippenbogen.Blutbild: Leukocyten 16o ooo/mm^3,davon 96% lymphoide Paramyeloblasten.Hb 13,7 g%,Ery 4,9 Mill./mm^3.Thrombocyten 5 ooo/mm^3.Sternalmark: 271 ooo kernhaltige Zellen,davon 93% lymphoide Paramyeloblasten.

Therapie und Verlauf: Gehäufte Bluttransfusionen,zum Teil als Frischblut.Teilremission unter hochdosierter Prednisolonbehandlung und der folgenden Kombinationsbehandlung mit Purinethol,dann Resistenz.Anfang August neuer Paramyeloblastenschub und zunehmende hämorrhagische Diathese.

Am 18.8. Injektion von 2o mg Methotrexat i.v. (Tab.II). Massiver Leukocytensturz von 13o ooo auf 7 ooo/mm^3 innerhalb von 2 Tagen.Geringer Rückgang des Paramyeloblastenanteils in der Peripherie.Keine zusätzliche hämorrhagische Diathese.Anstieg der Harnsäure im Serum auf 55,5 mg%.Nierenversagen mit Retention harnpflichtiger Substanzen (Harnstoff 72o mg%,Kreatinin 15,o mg%) und Hyperkaliämie von 7,9 mVal/L. Der Pat. starb anurisch am 25.8.

Die FH_2-Reduktase,deren Aktivität bei früheren Untersuchungen und unmittelbar vor der Injektion von 2o mg Methotrexat in den Leukocyten erhöht (o,28 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen) war,wurde schon nach 3o Minuten bei einer hohen Methotrexatkonzentration (Maximum nach 2 Stunden: 14,7 x $1o^{-3}$ µMol/$1o^{1o}$ Zellen) in den Zellen vollständig gehemmt.Nach 4 und 24 Stunden war durch Selektion resistenter Zellen eine geringe Aktivität des Enzyms zu messen,die Ausgangsaktivität war jedoch auch nach 48 Stunden noch nicht erreicht.

5.) Schwen. ♂ (26 J.).

Diagnose: Akute monocytoide Paramyeloblastenleukämie.

Aufnahmebefund (6.8.1964): Petechiale Hautblutungen und vereinzelt palpable Lymphknoten.Leber 1 Qf,Milz 1 cm tastbar.Blutbild:

Tabelle II.

Biochemische und hämatologische Befunde unter der Methotrexatbehandlung bei Pat. Her. ♂ (15 J.).

Datum	Mtx (mg)	FH_2-Reduktase (μMol/min/10^{10} Zellen).	Mtx-Gehalt (10^{-3} μMol/10^{10} Zellen).	Leukocyten pro mm^3	Paramyeloblasten (%)	Thrombocyten pro mm^3
18.8.64	20	0,28	0	129 000		34 000
30' nach		0	9,5			
2 Stdn.		0	14,7			
4 Stdn.		0,08	12,2			
19.8.64		0,07	5,4	108 000	80	13 500
20.8.64		0,18	0	7 000		
21.8.64				4 300	63	20 000
22.8.64				3 000		16 000
24.8.64				4 500		
25.8.64				1 000		

12 6oo Leukocyten pro mm^3,davon 6o% monocytoide Paramyeloblasten. Hb 11,8 g%,Ery 3,3 Mill./mm^3.Thrombocyten 6o ooo/mm^3.Sternalmark: 114 ooo kernhaltige Zellen,davon 49% überwiegend monocytoide Paramyeloblasten.

Therapie und Verlauf: Hochdosierte Prednisolonbehandlung (maximal 2oo mg täglich) ohne Erfolg.

Am 18.8. 1o mg Methotrexat i.v. (Tab.III).Keine Beeinflussung des weissen Blutbildes und der Thrombocyten unter der Behandlung.

Die vor der Injektion deutlich gesteigerte Aktivität der FH_2-Reduktase (o,53 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen) war bei geringem Methotrexateintritt in die Zellen (1,6 x $1o^{-3}$ µMol/$1o^{1o}$ Zellen) nach 3o Minuten vollständig gehemmt,aber schon nach 4 Stunden führte eine methotrexat - induzierte Enzymmehrproduktion zu einer Aktivitätssteigerung über den Ausgangswert hinaus.Der rasche Aktivitätsanstieg in Verbindung mit dem im wesentlichen unveränderten klinischen Bild wurde als Zeichen einer Therapieresistenz gewertet.

Vollremission unter folgender Purinethol - Behandlung.

6.) Kle. ♂ (48 J.).

Diagnose: Akute Paramyeloblastenleukämie.

Aufnahmebefund (1o.11.1964): Axilläre Lymphome,Hepatosplenomegalie (Leber 3 Qf,Milz 7 cm).Blutbild: Leukocyten 93 ooo/mm^3,davon 58% überwiegend monocytoide,zu einem geringen Teil auch lymphoide Paramyeloblasten.Hb 12,5 g%,Ery 4,3 Mill./mm^3.Thrombocyten 72 ooo/mm^3.Sternalmark: Etwa 1 Mill. kernhaltige Zellen,davon 25% Paramyeloblasten.

Therapie und Verlauf: Am 12.11. Injektion von 2o mg Methotrexat i.v. (Abb.9).Abfall der Leukocyten von 93 ooo auf 46 ooo/mm^3 in 3 Tagen.Am 17.11. gleichdosierte Methotrexat - Injektion.Wieder geringer Abfall der Leukocyten.Am 25.11. Injektion von 5o mg Methotrexat i.v. Kurzfristiger Abfall der Leukocyten auf 16 ooo/mm^3,dann wieder Anstieg in den folgenden Tagen.Im Differentialblutbild fielen nach den Methotrexat - Injektionen jeweils die monocytoiden Paramyeloblasten

Tabelle III.

Biochemische und hämatologische Befunde unter der Methotrexatbehandlung bei Pat. Schwen. ♂ (26 J.).

Datum	Mtx (mg)	FH_2-Reduktase (µMol/min/10^{10} Zellen).	Mtx-Gehalt (10^{-3} µMol/10^{10} Zellen).	Leukocyten pro mm^3	Paramyeloblasten (%)	Thrombocyten pro mm^3
18.8.64	10	0,53	0	7 200		51 800
30' nach		0	1,6			
2 Stdn.		0,06				
4 Stdn.		0,56				
19.8.64				14 200	38	85 000
20.8.64		0,15		12 600		
21.8.64				13 900		110 000
22.8.64		0,42		9 700	38	33 000

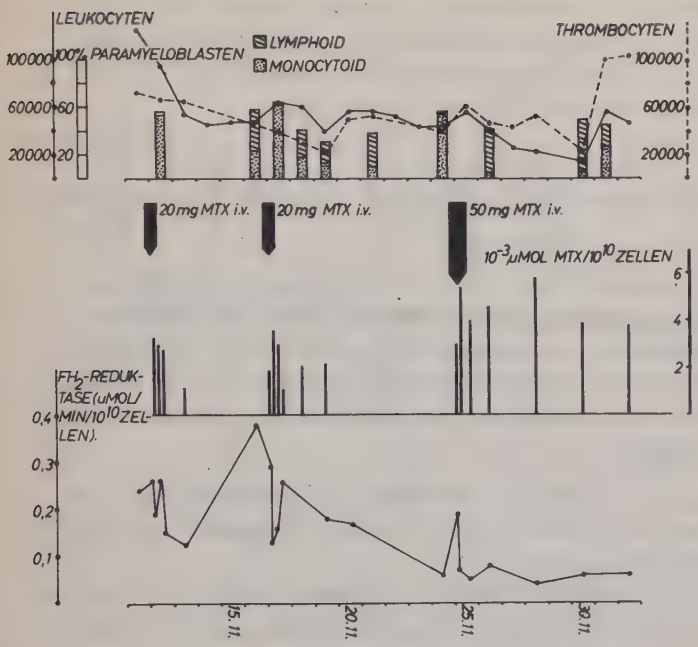

Abb.9: Biochemische Befunde und hämatologischer Verlauf unter der Methotrexatbehandlung bei Kle. ♂ (48 J.).

ab,während die lymphoide Zellpopulation unter der Behandlung unbeeinflusst blieb.

Nach der ersten Injektion von 2o mg Methotrexat i.v. Abfall der FH_2-Reduktase - Aktivität von o,26 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen auf o,15 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen bei einer maximalen intrazellulären Methotrexatkonzentration von 3,3 x $1o^{-3}$ µMol pro $1o^{1o}$ Zellen nach 3o Minuten.Am vierten Tag nach der Injektion Aktivitätsanstieg auf o,38 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen.Nach einer zweiten Injektion von 2o mg Methotrexat war die Enzymhemmung unmittelbar darauf und in den folgenden Tagen erneut nachweisbar.Ein nur vorübergehend 24 Stunden nach der Injektion nachweisbarer Anstieg der FH_2-Reduktase - Aktivität ist wahrscheinlich auf die Ausschwemmung von Zellen mit hoher

Enzymaktivität aus blutbildenden Organen rückzuführen.Nach der dritten,höherdosierten Methotrexat - Injektion (5o mg i.v.) wurde das Enzym langanhaltend und nahezu vollständig gehemmt.Zu einer Enzyminduktion kam es nicht.

7.) Wil. ♂ (14 J.).

Diagnose: Akute lymphoidzellige Paramyeloblastenleukämie.

Aufnahmebefund (22.1o.1964): Vereinzelt palpable Lymphknoten. Leber 3 Qf,Milz 3 cm unter dem Rippenbogen.Ausgeprägte hämorrhagische Diathese.Blutbild: Leukocyten 12o ooo/mm^3,davon 91% lymphoide Paramyeloblasten.Hb 6,5 g%,Ery 2 Mill./mm^3.Thrombocyten 36 ooo/mm^3. Sternalmark: 26o ooo kernhaltige Zellen,fast ausschliesslich lymphoide Paramyeloblasten.

Therapie und Verlauf: Gehäufte Bluttransfusionen,zum Teil als Frischblut.Hochdosierte Prednisolonbehandlung ohne hämatologische Besserung.

Am 1o.11. Injektion von 2o mg Methotrexat i.v. (Abb.1o). Zunächst keinerlei Ansprechen des Blutbildes auf die Behandlung.

Die zu Beginn der Behandlung erhöhte Aktivität der FH_2-Reduktase (o,39 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen) in den Leukocyten wurde nach der Injektion von 2o mg Methotrexat bei geringem Methotrexateintritt in die Zellen (Maximum nach 3o Minuten: 1,1 x $1o^{-3}$ µMol/$1o^{1o}$ Zellen) unvollständig gehemmt mit einem Maximum nach 24 Stunden (o,12 µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen).Die Aktivität stieg vorübergehend am 5. Tag durch Enzyminduktion auf o,9o µMol/min/$1o^{1o}$ Zellen bei nicht mehr nachweisbarer Methotrexatkonzentration in den Zellen an.

Am 6. Tag nach der Injektion kam es zu einem starken Abfall der Leukocyten und der FH_2-Reduktase - Aktivität.Am gleichen Tag (16.11.) erhielt der Pat. eine zweite Injektion von 5o mg Methotrexat i.v. Die Hemmung der FH_2-Reduktase zeigte sich unmittelbar darauf in einem noch stärkeren Abfall der Enzymaktivität.24 Stunden nach der Injektion war jedoch die FH_2-Reduktase - Aktivität schon wieder auf o,77 µMol pro

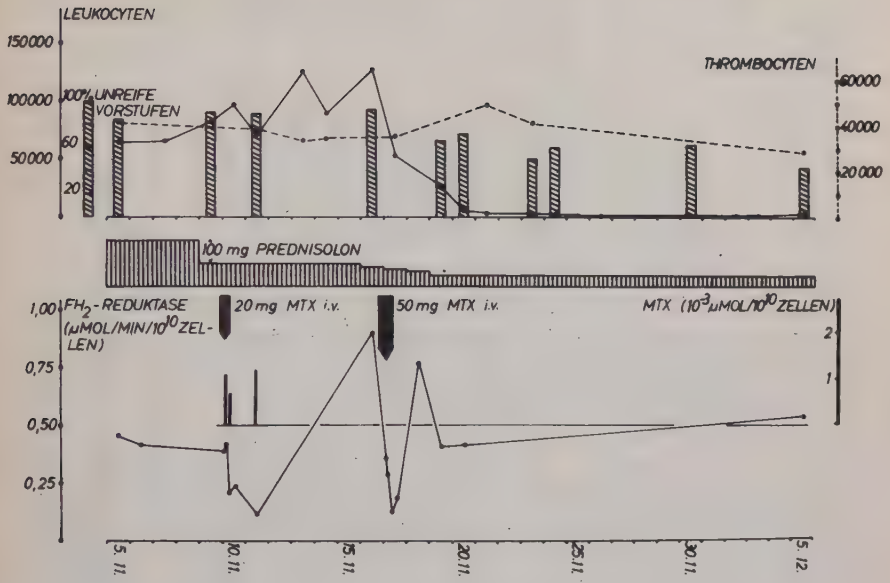

Abb.1o: Biochemische Befunde und hämatologischer Verlauf unter der Methotrexatbehandlung bei Wil. ♂ (14 J.).

Minute und $1o^{1o}$ Zellen angestiegen.Da die Leukocytenzahl in der gleichen Zeit bis auf 35 ooo/mm^3 (höchste Leukocytenzahl am Tage vor der zweiten Injektion: 125 ooo/mm^3) abgefallen waren,ist dieser Aktivitätsanstieg nicht auf eine Neuinduktion von Enzymprotein,sondern auf eine Selektion einer gegenüber Methotrexat resistenten Paramyeloblastenpopulation zurückzuführen.Das Medikament konnte nach der zweiten Injektion in den weissen Blutzellen nicht nachgewiesen werden.

Für eine Methotrexataufnahme durch Knochenmarkzellen - die nicht bestimmt werden konnte - spricht die in der folgenden Zeit einsetzende klinische und hämatologische Besserung mit Abfall der Paramyeloblasten im Differentialblutbild von 9o% auf 4o% und Anstieg der segmentkernigen Gra-

Tabelle IV.

Hämatologische Befunde unter der Methotrexatbehandlung bei 7 Patienten.

Patient	Diagnose	mg Mtx i.v.	Leukocytenabfall von	Leukocytenabfall auf	Leukocytenabfall in Tagen	Abfall d. Paramyeloblasten von	Abfall d. Paramyeloblasten auf	Abfall der Thrombocyten
Schwei. ♂	Chron. +)	1o	3oo ooo	2oo ooo	4	5o%	-	(+)
5o J.	Myelose	2o	3oo ooo	5o ooo	5	79%	36%	-
Grü. ♀	Chron. +)	2o	7o ooo	-	-	62%	-	-
49 J.	Myelose	5o	17o ooo	5 ooo	4	9o%	7o%	+
Bart. ♀	Subakute	1o	58o ooo	-	-	-	-	-
63 J.	Lymphoblast.							
Her. ♂	Akute	2o	13o ooo	7 ooo	2	8o%	63%	-
15 J.	Myelose							
Schwen. ♂	Akute	1o	8 ooo	-	-	45%	-	-
26 J.	Myelose							
Kle. ♂	Akute	2o	93 ooo	46 ooo	3	54%	24%	-
48 J.	Myelose	2o	65 ooo	4o ooo	2	++) 65%	11%	-
		5o	57 ooo	16 ooo	5	55%	6%	Anstieg
Wil. ♂	Akute	2o	97 ooo	54 ooo	7	91%	-	-
14 J.	Myelose	5o	54 ooo	6 ooo	3	94%	44%	-

Thrombocyten: - kein Abfall, (+) geringer Abfall ohne hämorrhagische Diathese, + starker Abfall mit unter der Therapie aufgetretenen hämorrhagischen Diathese.

+) Akuter Schub bei chron. Myelose

++) monocytoide Paramyeloblasten

nulocyten von 3% auf 3o%.Die Thrombocyten nahmen unter der Therapie nicht wesentlich ab.

Die wichtigsten hämatologischen Befunde der 7 mit Methotrexat behandelten Patienten im Alter zwischen 14 und 63 Jahren sind in Tab.IV zusammengestellt.

Das Blutbild verhielt sich im wesentlichen unverändert bei Bart. und Schwen. Deutlich beeinflusst unter der Behandlung wurde es bei den Pat. Schwei.,Grü.,Wil. und Kle.

Die Leukocyten waren im allgemeinen 48 Stunden nach der Injektion signifikant abgefallen.Bei Schwei. und Grü. erfolgte dieser Leukocytenabfall erst nach der zweiten höherdosierten Methotrexat - Injektion.Eine Ausnahme bildete der Pat. Wil.,bei dem die Leukocyten erst 6 Tage nach der ersten Injektion abfielen,nachdem sie in der Zwischenzeit noch auf höhere Werte angestiegen waren.

Dem Leukocytenabfall ging ein Rückgang der Paramyeloblasten im Differentialblutbild parallel.Die bessere Ausreifung des weissen Blutbildes war bei Grü. und Her. nur gering; bei Kle. nahm unter der Methotrexatbehandlung die monocytoide Paramyeloblastenpopulation ab,während der relative Anteil lymphoider Zellen anstieg.

Bei Grü. äusserte sich die Methotrexatwirkung in einem starken Abfall der unreifen weissen Blutzellen,gleichzeitig aber auch der Thrombocyten,wodurch es zu einer ausgeprägten hämorrhagischen Diathese kam.Bei den übrigen Pat. fielen die Thrombocyten nicht wesentlich ab;sie stiegen bei Kle. sogar von 5o ooo auf 1oo ooo/mm^3 an.

I. Dihydrofolsäure - Reduktase in Leukocyten.

Vor Beginn der Methotrexatbehandlung war die Aktivität der FH_2-Reduktase in den Leukocyten erhöht,wie es nach Untersuchungen von BERTINO (6) und WILMANNS(65-69) bei chronischen und akuten Myelosen zu erwarten ist.Lediglich in den Leukocyten der Pat. Bart. konnte kein Substratumsatz nachgewiesen werden.

Die Hemmung der FH_2-Reduktase war im allgemeinen schon 3o Minuten nach der Injektion von Methotrexat in einer Dosierung zwischen 1o und 5o mg so ausgeprägt,dass kein oder nur ein sehr geringer Dihydrofolsäureumsatz in den Leukocyten nachweisbar war.

Die nicht vollständige Hemmung des Enzyms nach den beiden ersten Injektionen bei Kle. (Abb.9) und den Injektionen bei Wil. (Abb.1o) kann zurückgeführt werden auf:

1.) einen zu geringen Methotrexateintritt in die Zellen.

2.) eine zu hohe Ausgangsaktivität der FH_2-Reduktase in den Zellen,wodurch höhere Methotrexatkonzentrationen gebunden werden.

3.) eine rasch ablaufende Enzymmehrproduktion durch Induktion.

4.) eine relativ grosse Population methotrexat - impermeabler Zellen.

5.) eine metabolische Inaktivierung des Folsäureantagonisten.

Bei abfallenden Leukocytenzahlen kann es zum Wiedererscheinen einer messbaren Enzymaktivität durch Selektion resistenter Zellen kommen (Abb.7,8 und 1o,Tab.II).Diese Resistenz kann beruhen auf:

1.) einer sehr hohen Ausgangsaktivität in wenigen resistenten Zellen und einer unvollständigen Enzymhemmung in diesen Zellen.

2.) einem ungehemmten Enzym in methotrexat - impermeablen Zellen.

3.) Enzyminduktion in resistenten Paramyeloblasten.

4.) Enzyminduktion in reifen Leukocyten.

Diese Selektion weniger resistenter Zellen muss nicht als Zeichen einer Therapieresistenz gedeutet werden.

Bei im wesentlichen unveränderten Leukocytenwerten kann es methotrexat - induziert zu einem Aktivitätsanstieg der FH_2-Reduktase durch eine Mehrproduktion von Enzymprote-

in kommen.Auf diese Weise vermag die Zelle eingetretenes Methotrexat abzubinden und dessen Wirkung zu kompensieren.Diese Zellen sind einer Methotrexatbehandlung gegenüber resistent.

Bei Schwei. (Abb.7) wurde 24 Stunden nach der ersten Methotrexat - Injektion,bei Schwen. (Tab.III) schon 4 Stunden nach der Injektion ein Aktivitätsanstieg auf den Ausgangswert durch Enzyminduktion beobachtet;bei Wil. (Abb.1o) hatte sich die Aktivität 5 Tage nach der ersten Injektion von 2o mg Methotrexat gegenüber der Ausgangsaktivität verdoppelt.

II. Methotrexat im Serum.

Methotrexat zirkuliert zum Teil frei im Serum,zum Teil ist es an Serumproteine gebunden (26).Der Anteil des protein - gebundenen Medikamentes beträgt nach FREEMAN zwischen 37 und 47%.

Bei der Methotrexatbestimmung durch Titration mit aus Hühnerleber angereicherter FH_2-Reduktase wird infolge der hohen Affinität des Antagonisten zum Enzymprotein auch das protein - gebundene Methotrexat im Serum ohne vorherige Enteiweissung erfasst.

Bei 6 der mit Methotrexat behandelten Pat. wurde 3o Minuten,2,4 und 24 Stunden nach der Methotrexat - Injektion die Methotrexatkonzentration im Serum gemessen.Kontrolluntersuchungen vor Injektion ergaben bei Zusatz von Serum zu den Inkubationsansätzen keine Hemmung der FH_2-Reduktase.

Die Ergebnisse sind in Tab.V zusammengestellt.

Die Höhe des Methotrexatserumspiegels wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst:

1.) Von der verabreichten Dosis.

2.) von der in den Leukocyten aufgenommenen Methotrexatmenge,die ihrerseits bestimmt wird von der Anzahl der Leukocyten pro Volumeinheit,von der Zellpermeabilität und der Aktivität der FH2-Reduktase in den leukämischen Zellen.

Bei Schwei. wurde das Medikament in hoher Konzentration in die leukämischen Zellen aufgenommen,wodurch bei der hohen Zellzahl des Pat. ein niedriger Methotrexatserumspiegel

Tabelle V.

Methotrexatserumspiegel bei 6 mit Methotrexat behandelten Patienten.

Pat.	Mtx (mg)	Methotrexat im Serum (µg/L). nach 3o min	2 Stdn.	4 Stdn.	24 Stdn.
Schwei.	2o	144	122	88	7
Bart.	1o	594	227	9o	9
Her.	2o	648	432	464	113
Schwen.	1o	473	95	28	9
Wil.	2o	841	459	172	4
	5o	666	235	82	13
Kle.	2o	757	285	122	35
	2o	399	8o	69	o

zum Teil erklärt ist.Eine hohe Methotrexatkonzentration im Serum wurde bei Bart. durch die Impermeabilität der Leukocyten für Methotrexat erreicht.

3.) Durch eine starke Methotrexatbindung in verschiedenen Organen wird der Methotrexatgehalt im Serum vermindert. Diese Methotrexatbindung geht der Höhe der FH_2-Reduktase - Aktivität in den betreffenden Organen parallel (56).So finden wir das Medikament bevorzugt in Leber,Milz,Niere und Knochenmark (15,23,24).

Der geringe Methotrexatgehalt im Serum bei Schwei. muss nicht allein durch die starke Methotrexataufnahme der Leukämiezellen bedingt sein,sondern kann teilweise auf die hohe Methotrexatbindung in Leber und Milz zurückgeführt werden.13 Tage nach der Injektion von 2o mg Methotrexat war in den autoptisch konservierten Organen noch 5,5% der applizierten Dosis nachzuweisen (Leber o,8 mg,Milz o,3 mg).

Auffallend niedrig lag der Methotrexatserumspiegel nach der zweiten Injektion von 5o mg Methotrexat bei Wil. Er wird zum Teil erklärt durch eine hohe Methotrexatbindung im Knochenmark,zurückzuführen auf eine durch Enzyminduktion nach der ersten Injektion stark erhöhte FH_2-Reduktase - Aktivität (4,75

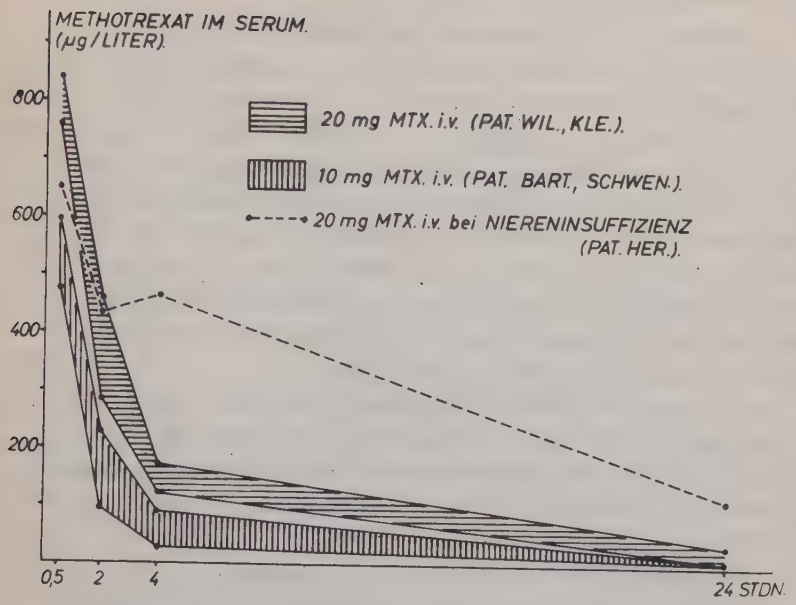

Abb.11: Abfall des Methotrexatserumspiegels in 24 Stunden.

µMol/min/10^{10} Zellen). Der geringe Methotrexatgehalt im Serum bei Wil. hat eine weitere Ursache: Die zweite Methotrexat - Injektion erfolgte bei stark abfallenden Leukocytenzahlen und zurückgehender FH_2-Reduktase - Aktivität in den Zellen. Das bei dem Zerfall der Leukocyten freigewordene Enzym bindet Methotrexat im Serum, welches durch die Bestimmungsmethode ohne Enteiweissung nicht erfasst wird.

4.) Von Bedeutung für den Methotrexatspiegel im Serum ist ausserdem die Nierenfunktion. Eine insuffiziente Nierenfunktion führte bei Her. zu einer lang anhaltenden Retention des Medikamentes im Serum (Abb.11).

Im allgemeinen war das Medikament 24 Stunden nach der Injektion im Serum nur noch in Spuren nachzuweisen. Der stärkste Abfall wurde in den ersten beiden auf die Injektion folgenden Stunden beobachtet (Abb.11).

III. Methotrexatausscheidung im Urin.

BURCHENAL et al. konnten 1951 unter Verwendung des mikrobiologischen Tests mit S.faecalis als Testorganismus eine Methotrexatausscheidung nachweisen,die am ersten Tag 4o - 57% der applizierten Dosis betrug (14).FREEMAN wies fluorometrisch eine nahezu vollständige Ausscheidung des Medikaments schon am ersten Tag nach (26).WERKHEISER bestimmte durch Titration mit FH_2-Reduktase eine Methotrexatausscheidung von 65% an den beiden auf die Injektion folgenden Tagen (61).Neuerdings verwenden JOHNS et al. radioaktiv markiertes Methotrexat und finden 4o% der Radioaktivität in den ersten beiden Tagen nach der Injektion im Urin wieder (39).

Bei 6 der mit Methotrexat behandelten Pat. wurde die Ausscheidung des Medikaments im Urin durch Titration mit einer aus Hühnerleber angereicherten FH_2-Reduktase bestimmt. Das Enzym wird durch entsprechende Urinmengen,die vor der Methotrexat - Injektion erhalten wurden,nicht gehemmt.

Die Ergebnisse sind in Tab.VI aufgeführt.

Sehen wir von den beiden erstgenannten Pat. ab,so betrug die Methotrexatausscheidung am ersten Tag zwischen 5o und 78% der verabreichten Dosis.Auch am zweiten Tag nach der Injektion konnte noch eine beträchtliche Ausscheidung des Medikaments nachgewiesen werden (durchschnittlich 1o% der applizierten Dosis).An den beiden folgenden Tagen war Methotrexat nur noch in Spuren im Urin zu finden.

Bei zwei Pat. wurde die Methotrexatausscheidung im Verlauf des ersten Tages untersucht (Tab.VII).Der grösste Teil wurde in den ersten beiden Stunden nach der Injektion ausgeschieden (ca. 53% der Ausscheidung des ersten Tages), nach 6 Stunden waren 65 - 85% der am ersten Tag ausgeschiedenen Methotrexatmenge im Urin nachzuweisen.

Starke toxische Nebenwirkungen sind möglicherweise auf eine zu geringe (Pat. Grü.) oder verzögerte (Pat. Her.) Ausscheidung des Medikaments zurückzuführen,zwanglos zu erklären durch den langdauernden Kontakt der proliferativen Gewebe mit dem Medikament (16).

Tabelle VI.

Methotrexatausscheidung im Urin.

Pat.	Mtx (mg)	1.Tag		2.Tag	
		mg	% der applizierten Dosis.	mg	% der applizierten Dosis.
Schwei.	2o	5,o	25	o,3	1,5
Grü.	2o	1,4	7	o,1	o,5
	5o	1,9	3,8	o,5	1,o
Bart.	1o	6,6	66	o,4	4,o
Her.	2o	11,1	55,5	3,o	15
Schwen.	1o	7,8	78	o,2	2,o
Kle.	2o	14,6	73	3,1	15,5
	2o	1o,2	51	2,9	14,5
	5o	32,7	65,4	8,4	16,8

Tabelle VII.

Methotrexatausscheidung am 1. Tag bei den Pat. Her. und Schwen.

Pat.	Mtx (mg)	Methotrexatausscheidung (mg)			
		o-2 Stdn.	2-6 Stdn.	6-12 Stdn.	12-24 Stdn.
Her.	2o	5,3	1,9	1,o	2,9
Schwen.	1o	4,5	2,2	o,9	o,2

IV. Methotrexat in Leukocyten.

Die Methotrexatkonzentration wurde in isolierten peripheren Leukocyten 3o Minuten,2,4 und 24 Stunden nach der Injektion bestimmt und in den nächsten Tagen weiter verfolgt. Kontrolluntersuchungen vor der Injektion ergaben keine Hemmung der FH_2-Reduktase durch Zusatz von auf gleiche Weise zubereiteten Leukocytencytolysats in den Inkubationsansätzen.

In fast allen Fällen wurde 3o Minuten bis 2 Stunden nach der Injektion des Folsäureantagonisten das Maximum der Methotrexatkonzentration in den Leukocyten bestimmt (Tab.VIII). Die von den Leukocyten aufgenommene Methotrexatmenge zeigt eine Abhängigkeit von der Zellpermeabilität,dem Methotrexatangebot im Serum und der FH_2-Reduktase - Aktivität in den Zellen.Eine lineare Abhängigkeit der in den Zellen aufgenommenen Methotrexatmenge von dem Methotrexatserumspiegel und der FH_2-Reduktase - Aktivität besteht bei der für jede Zelle spezifischen Zellpermeabilität für das Medikament nicht.

Nach einem geringen bis stärkeren Rückgang des Methotrexatgehalts in den auf die Injektion folgenden Stunden stieg die Methotrexatkonzentration in den Zellen häufig wieder an (Abb.7,8 und 9),vermutlich durch Aufnahme von Methotrexat,das aus zerfallenen Zellen frei wurde.Das Medikament blieb meist über längere Zeit in den Leukocyten nachweisbar.

Die Methotrexatabnahme in den Zellen trotz der festen Bindung des Antagonisten an die FH_2-Reduktase kann auf verschiedene Weise zustande kommen:

1.) Austritt von dialysierbarem Methotrexat bei einem Methotrexatüberschuss in den Zellen.

2.) Zerfall von Zellen mit hohem Methotrexatgehalt und Überleben von Zellen mit geringer Methotrexatkonzentration.

3.) Metabolische Inaktivierung des Medikamentes in den Zellen.

Schon 3 Tage nach der Injektion war bei Her. kein Methotrexat in den Zellen mehr nachweisbar (Tab.II).Dieses ist zurückzuführen auf den massiven Zerfall methotrexathaltiger Paramyeloblasten und Selektion von Zellen mit sehr geringem Methotrexatgehalt.

Die biochemischen Befunde bei Bart.,deren Zellen kein Methotrexat aufnahmen und die Selektion von für Methotrexat nur sehr gering permeablen Zellen unter der Therapie bei Her. und Wil. zeigen,dass für menschliche Leukämiezellen ein herabgesetzter Methotrexattransport in die Zellen oder eine Im-

permeabilität der Zellen für Methotrexat diskutiert werden muss.

D I S K U S S I O N :

Schon vor der näheren Kenntnis von den Angriffspunkten der Folsäureantagonisten im Stoffwechselgeschehen der Zellen war die Resistenzentwicklung gegenüber diesen Antimetaboliten der Anlass vieler experimenteller Untersuchungen (2,3,13,4o,44-47,52,54,58).

FISCHER zeigte durch Untersuchungen an Mäuseleukämiezellen,dass Methotrexat über einen aktiven,Energie verbrauchenden Transportmechanismus - wahrscheinlich an ein Trägerprotein gebunden - in die Zellen gelangt.Durch eine Abnahme der Permeabilität,möglicherweise durch eine Abänderung des Trägerproteins hervorgerufen,konnte er einen 7o fachen Anstieg der Resistenz gegenüber Methotrexat nachweisen (21).

In der Zelle wird Methotrexat an FH_2-Reduktase gebunden.Überschüssiges Methotrexat ist zum Teil an Zellproteine fixiert,zum Teil im intrazellulären Wasser gelöst und deshalb gegen Pufferlösungen dialysierbar (2o).

Ein herabgesetzter Methotrexattransport oder eine Impermeabilität der Zelle für Methotrexat als Ursache der Therapieresistenz wird von verschiedenen Untersuchern diskutiert (21,44,47,58,72).

Nach den experimentellen Ergebnissen bei Bart. kommt dieser Mechanismus auch bei menschlichen Leukosen für eine Resistenzentwicklung gegenüber Methotrexat ursächlich in Frage.Bei Wil. muss die Selektion einer für Methotrexat nur sehr gering permeablen Zellpopulation unter der Behandlung angenommen werden.Trotz einer zweiten,höherdosierten Methotrexat - Injektion konnte das Medikament in den leukämischen Zellen nicht mehr nachgewiesen werden.

JACOBSON glaubt die Resistenz gegenüber Methotrexat auf eine metabolische Inaktivierung des Medikamentes in leukämischen Zellen rückführen zu können (37).Eine veränderte Affinität des Enzyms zum Antagonisten konnte bisher in resistenten Zellen experimentell nicht bewiesen werden.

In Publikationen der letzten Jahre häufen sich die Befunde einer gesteigerten Aktivität der FH_2-Reduktase in methotrexat - resistenten leukämischen Zellen (7-1o,2o,32,33, 42).Dieser Aktivitätsanstieg des Enzyms erklärt unschwer den in amethopterin - resistenten Zellen gesteigerten Formiat - und Glycin - Einbau in Nukleinsäuren (52,54) und die nicht oder nur unwesentlich gehemmte Folinsäurebildung (2,45,47).

BERTINO und Mitarbeiter konnten einen Aktivitätsanstieg der FH_2-Reduktase auch in peripheren nichtleukämischen Leukocyten und in Erythrocyten nachweisen (7-1o) in denen eine Aktivität gewöhnlich nicht zu messen ist.Diesen Zellen bietet die Neuinduktion von Enzymprotein Schutz vor cytotoxischen Nebenwirkungen.

Eine methotrexat - induzierte Enzymmehrproduktion ist - vorausgesetzt,dass das Medikament in die Zellen gelangt - für jede leukämische Zelle anzunehmen,ob dieser Vorgang jedoch zur Resistenz führt,ist von weiteren Faktoren,oder richtiger ihrem Verhältnis zueinander,abhängig:

1.) Von der Geschwindigkeit der Enzymneubildung.So führte eine überstürzte Neubildung von Enzymprotein bei Schwen. nach einer vollständigen Hemmung schon 4 Stunden nach der Injektion zu einem Aktivitätsanstieg der FH_2-Reduktase auf den Ausgangswert (Tab.III).Auch bei Schwei. (Abb.7) und Wil. (Abb. 1o) wurde jeweils nach der ersten Injektion ein Aktivitätsanstieg durch Enzyminduktion beobachtet.

2.) Von der Methotrexatkonzentration in der Zelle.Ein Konzentrationsmaximum wurde in den Zellen in den meisten Fällen schon 3o Minuten,bei einem langsamen Methotrexateintritt in die Zellen spätestens 2 Stunden nach der Injektion bestimmt.Dass das Konzentrationsmaximum zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird,ist insofern unwahrscheinlich,als nach 2 Stunden der Methotrexatserumspiegel stark abgefallen und das Medikament durch die Nieren weitgehend ausgeschieden ist.

3.) Möglicherweise von der Konzentration an vorgebildeten Tetrahydrofolsäure - Verbindungen,Purinen und Nukleotiden,auf welche die Zelle unter der Methotrexat - Medikation vorübergehend zurückgreifen kann.

4.) Von der Proliferationsrate und der Lebensdauer der leukämischen Zellen.Infolge des gesteigerten Nukleinsäurestoffwechsels sind schnell proliferierende Zellen diesen Stoffwechsel hemmenden Substanzen gegenüber sehr empfindlich.Die früher vielfach angenommene gesteigerte Proliferation leukämischer Zellen muss heute aus folgenden Gründen als widerlegt gelten:

a.) Die DNS - Synthese,gemessen am Einbau von tritium - markiertem Thymidin und von P^{32},ist im Vergleich mit normalen Knochenmarkzellen in leukämischen Zellen sehr gering (FLIEDNER,CRONKITE und BOND;GAVOSTO,MARINARI und PILERI;CRADDOCK und NAKAI)(18,22,29).

b.) Nach SMELLIE,KEIR und DAVIDSON sind in Myeloblasten im Vergleich zu normalen Leukocyten die nukleotid - polymerisierenden Enzyme vermindert (55).

c.) MÜLLER fand bei quantitativen feulgenphotometrischen Messungen in Paramyeloblasten nur ganz vereinzelt Zellen mit stark erhöhtem DNS - Gehalt (43).

d.) Bei akuten Myelosen findet man im Knochenmarkausstrich einen geringen Mitose - Index (ASTALDI und MAURI; GROSS und Mitarbeiter)(4,31).

Auf Grund dieser experimentellen Befunde nimmt man heute für Myeloblasten eine im Vergleich zu normalen Leukocyten verlängerte Lebensdauer an.Dass dennoch häufig Leukämiezellen durch Folsäureantagonisten bevorzugt geschädigt werden,kann seine Ursache darin haben,dass Paramyeloblasten mit herabgesetzter Verwertung von Thymidin für die DNS - Synthese besonders auf eine Thyminmethylgruppen - Synthese aus "C_1"-Fragmenten unter Beteiligung der FH_2-Reduktase angewiesen sind (7o).

Bei raschem Eintritt von Methotrexat in hoher Konzentration in die leukämischen Zellen und bei nur geringer Enzymneubildung wird ein Methotrexatüberschuss über längere Zeit neugebildetes Enzymprotein abtitrieren.Bei kurzem Teilungszyklus ist die Überlebensdauer der Zelle kürzer als die Zeitspanne bis zum Wiedererscheinen einer messbaren Enzymaktivität.Diese methotrexat - sensible Zelle wird absterben,

ehe sie in der Lage ist,ihre proliferative Tätigkeit fortzusetzen.

Bei längerer Überlebensdauer ist ein Therapieerfolg dann zu erwarten,wenn nur geringe toxische Nebenerscheinungen eine Anwendung des Medikamentes in kurzen zeitlichen Intervallen zulassen.

Bei geringem Methotrexateintritt in die leukämischen Zellen bleibt entweder das Enzym bei hoher Ausgangsaktivität unvollständig gehemmt,oder es kommt bei niedriger Ausgangsaktivität nach einer vollständigen Hemmung erneut zu einem Aktivitätsanstieg durch Enzyminduktion.Der Teilungszyklus ist folglich nicht unterbrochen.Die zur vollständigen Hemmung der durch Enzyminduktion erhöhten Aktivität adäquate Methotrexatmenge wird unter Umständen vom Organismus nicht mehr toleriert.Die Zellen sind resistent,da toxische Nebenwirkungen überwiegen.

Die Entwicklung einer Resistenz hängt daher hauptsächlich mit der Aktivität der FH_2-Reduktase und der Methotrexatkonzentration in der leukämischen Zelle zusammen und ist somit ein Problem der Zellpermeabilität für Methotrexat und der Dosierung des Medikamentes.Die bei ungenügender Dosierung erreichten Methotrexatkonzentrationen in den leukämischen Zellen reichen nicht aus,um durch Induktion neugebildetes Enzymprotein über längere Zeit abzubinden.Auf der anderen Seite birgt die Überdosierung des Medikamentes erhebliche Gefahren für den Patienten in sich.Die genannten biochemischen Untersuchungen,im besonderen die Bestimmung der FH_2-Reduktase - Aktivität und der Methotrexatkonzentration in den Leukocyten,sowie des Methotrexatserumspiegels und der Ausscheidung des Medikamentes,gestatten,eine sinnvolle Methotrexatdosierung zu finden und eine Kumulation des Medikamentes im Organismus zu verhindern.

Das Verhalten der FH_2-Reduktase und die Höhe der Methotrexatkonzentration in isolierten Leukocyten nach einer Testdosis von 1o - 2o mg Methotrexat i.v. sind in Tab.VIII zusammengestellt.Für die Empfindlichkeit oder Resistenz der Leukämiezellen sind nach den gewonnenen Ergebnissen folgen-

Tabelle VIII.

FH_2-Reduktase und Methotrexatkonzentration in Leukämiezellen nach i.v. Methotrexat-Injektion.

Pat.	Mtx (mg)	FH_2-Reduktase (μMol/min/10^{10} Zellen) vor Injektion	niedrigste Aktivität nach Mtx-Injektion Zeit	niedrigste Aktivität nach Mtx-Injektion Aktivität	Aktivitätsanstieg nach Mtx-Injektion Zeit	Aktivitätsanstieg nach Mtx-Injektion Aktivität	Höchste Mtx-Konzentration (10^{-3} μMol/10^{10} Zellen) nach Mtx-Injektion Zeit	Höchste Mtx-Konzentration (10^{-3} μMol/10^{10} Zellen) nach Mtx-Injektion Mtx-Konzentr.	Abfall der Paramyeloblasten
Schwei.	1o	o,14	2 h	o,o4	1 Tag	o,17	1 Tag	4	-
	2o	o,35	3o min	o	7 Tage	o,18	3o min	11,3	+
Grü.	2o	o,22	8 h	o	3 Tage	o,1	2 h	4,2	-
	5o	o,12	4 h	o,o2	5 Tage	o,47	3o min	2o,o	+
Bart.	1o	o		o		o		o	-
Her.	2o	o,28	3o min	o	3 Tage	o,18	2 h	14,7	+
Schwen.	1o	o,53	3o min	o	4 h	o,56	2 h	1,6	-
Kle.	2o	o,26	4 h	o,14	4 Tage	o,38	3o min	3,3	Abfall der
	2o	o,34	3o min	o,18	-	-	3o min	3,6	monocytoi-
	5o	o,18	4 h	o,o5	-	-	3o min	5,2	den Zellen
Wil.	2o	o,4	2 h	o,12	5 Tage	o,9	3o min	1,2	-
	5o	o,36	2 h	o,11	24 h	o,77		o	+

de Kriterien entscheidend:

1.) Der Grad der FH_2-Reduktase - Hemmung.

2.) Die Geschwindigkeit der Neuinduktion von FH_2-Reduktase - Enzymprotein, erkennbar an der Dauer der FH_2-Reduktase-Hemmung. Diese Hemmung sollte bei gleichbleibender Zellzahl mindestens 3 Tage nachweisbar sein. Bei gleichzeitig abfallender Zellzahl muss ein Wiederanstieg der FH_2-Reduktase nicht Folge einer Induktion sein, sondern kann durch Selektion von Myeloblasten oder reifen Leukocyten mit hoher FH_2-Reduktase-Aktivität bedingt sein.

3.) Die Methotrexatkonzentration sollte nach den Ergebnissen mehr als 3×10^{-3} µMol/10^{10} Zellen betragen.

Die beschriebenen biochemischen Untersuchungen erlauben eine Beurteilung der Empfindlichkeit von Leukämiezellen gegenüber Folsäureantagonisten, möglicher toxischer Nebenwirkungen und somit eine rasche Entscheidung darüber, ob nach einer ersten Injektion eine weitere Behandlung mit Methotrexat erfolgversprechend ist. Sie geben darüber hinaus Hinweise für die im Einzelfall sinnvoller Dosierung des Medikamentes.

ZUSAMMENFASSUNG:

Bei 7 Leukämie - Patienten werden nach einer intravenösen Methotrexat - Injektion die Verteilung des Medikamentes in den weissen Blutzellen und im Serum, die Ausscheidung im Urin und ausserdem die FH_2-Reduktase - Aktivität in isolierten Leukocyten untersucht.

1.) Bereits 3o Minuten bis 2 Stunden nach einer einmaligen intravenösen Methotrexat - Injektion kommt es zu einem signifikanten Abfall der FH_2-Reduktase - Aktivität auf nicht oder kaum messbare Werte.

2.) Durch Säurebehandlung kann das pseudoirreversibel an das Enzymprotein gebundene Methotrexat abdissoziieren und durch Titration mit einer aus Hühnerleber angereicherten FH_2-Reduktase quantitativ bestimmt werden. Ein Konzentrationsmaximum in den Leukocyten wird im allgemeinen 3o Minuten bis 2 Stunden nach der Injektion gefunden.

3.) Bei bestehender Resistenz gegenüber Methotrexat kommt es schnell zum erneuten Aktivitätsanstieg der FH_2-Reduktase bis auf ein mehrfaches der vor Injektion des Medikamentes gemessenen Aktivität in weniger als 3 Tagen bei therapeutisch ausreichenden Methotrexatkonzentrationen in den Leukocyten und bei unverändert hoher Zellzahl. Der Aktivitätsanstieg wird in erster Linie auf eine Induktion neuen Enzymproteins zurückgeführt. Bei gleichzeitig abfallender Zellzahl kann ein erneuter Anstieg der FH_2-Reduktase - Aktivität durch Selektion von Myeloblasten oder auch reifen Leukocyten mit relativ hoher Enzymaktivität bedingt sein und ist nicht als Zeichen einer Therapieresistenz zu werten.

4.) Resistenz gegenüber Methotrexat kann ausserdem auf einem ungenügenden Methotrexattransport in die Zellen bzw. auf einer Impermeabilität der Zellen für das Medikament beruhen.

5.) Der von der Dosierung abhängige Methotrexatserumspiegel ist in 24 Stunden auf kaum messbare Werte abgefallen. Bei bestehender Niereninsuffizienz bleibt das Medikament über lange Zeit im Serum nachweisbar.

6.) Die Methotrexatausscheidung im Urin beträgt im Durchschnitt am 1. Tag 65%, am 2. Tag noch 1o% der applizierten Dosis. Die Ausscheidung ist verzögert bei Niereninsuffizienz.

L I T E R A T U R :

(1) ACKERMANN,W.W.,and POTTER,V.R. Enzyme Inhibition in Relation to Chemotherapy.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 72: 1-9 (1949).

(2) ANTON,A.H.,and NICHOL,C.A. Studies on the Nature of Resistance of S.faecalis to Folic Acid Antagonists.
Biochem.Pharmacol. 3: 1-9 (1959).

(3) ARONOW,L. Studies on Drug Resistance in Mammalian Cells.I.Amethopterin Resistance in Mouse Fibroblasts.
J.Pharmacol. 127: 116-121 (1959).

(4) ASTALDI,G.,MAURI,C. Recherches sur l' activitè proliférative de l' hèmocytoblaste de la leucèmic aique.
Rev.Belge Path. 23: 59 (1953).

(5) BALIS,M.E.,and DANCIS,J. Effects of Amethopterin on Nucleic Acid Synthesis in Leukemic Spleen Breis.
Cancer Res. 15: 603-608 (1955).

(6) BERTINO,J.R.,GABRIO,B.W.,and HUENNEKENS,F.M. Dihydrofolic Reductase in Human Leukemic Leukocytes.
Biochem.Biophys.Research.Commun. 3: 461-465 (1960).

(7) BERTINO,J.R.,SIMMONS,B.M.,and DONOHUE,D.M. Studies on the Mechanism of Resistance to the Folic Acid Antagonists.
Clin.Res. 9: 157 (1961).

(8) BERTINO,J.R.,DONOHUE,D.M.,GABRIO,B.W.,SILBER,R.,ALENTY,A., MEYER,M.,and HUENNEKENS,F.M. Increased Levels of Dihydrofolic Reductase Activity in Leukocytes of Patients Treated with Amethopterin.
Nature 193: 140-141 (1962).

(9) BERTINO,J.R.,DONOHUE,D.M.,GABRIO,B.W.,SILBER,R.,and HUENNEKENS, F.M. The Induction of Dihydrofolic Reductase Activity in Leukocytes and Erythrocytes of Patients Treated with Amethopterin.
J.Clin.Invest. 42: 466-475 (1963).

(10) BERTINO,J.R. Mechanism of Action of Folate Antagonists.
Cancer Res. 23: 1286-1306 (1963).

(11) BLAKLEY,R.L. Crystalline Dihydropteroylglutamic Acid. Nature 4o: 1684 (1961).

(12) BÜCHER,T. Über ein Phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochim.Biophys.Acta 1: 292-314 (1948).

(13) BURCHENAL,J.H.,ROBINSON,E.,JOHNSTON,S.F.,and KUSHIDA,M.N. The Induction of Resistance to 4-Amino-N_{1o}-methylpteroylglutamic Acid in a Strain of Transmitted Mouse Leukemia. Science 111: 116-117 (195o).

(14) BURCHENAL,J.H.,WARINGS,G.B.,ELLISON,R.R.,and REILLY,H.C. A Simple Method for Determination of Levels of Amethopterin in Blood and Urine. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 78: 6o3-6o6 (1951).

(15) CHARACHE,S.,CONDIT,P.T.,and HUMPHREYS,S.R. Studies on the Folic Acid Vitamins.IV.The Persistance of Amethopterin in Mammalian Tissues. Cancer 13: 236-24o (196o).

(16) CONDIT,P.T.,and ELIEL,L.P. Effects of Large Infrequent Doses of Amethopterin on Acute Leukemia in Children. J.A.M.A. 172: 451-453 (196o).

(17) CONDIT,P.T.,SHNIDER,B.I.,OWENS,A.H.,Jr.,Studies on the Folic Acid Vitamins.VII.The Effects of Large Doses of of Amethopterin in Patients with Cancer. Cancer Res. 22: 7o6-712 (1962).

(18) CRADDOCK,C.G.,and NAKAI,G.S. Leukemic Cell Proliferation as Determined by an in Vitro Deoxyribonucleic Acid Synthesis. J.Clin.Invest. 41: 36o-369 (1962).

(19) FARBER,S.,DIAMOND,L.K.,MERCER,R.D.,SYLVESTER,R.F.,Jr.,and WOLFF,J.A. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist 4-Amethopteroylglutamic Acid (Aminopterin). New Engl.J.Med. 338: 787-793 (1948).

(2o) FISCHER,G.A. Increased Levels of Folic Acid Reductase as a Mechanism of Resistance to Amethopterin in Leukemic Cells. Biochem.Pharmacol. 7: 75-77 (1961).

(21) FISCHER,G.A. Defective Transport of Amethopterin (Methotrexate) as a Mechanism of Resistance to the Antimetabolite in L 5178 Y Leukemic Cells.
Biochem.Pharmacol. 11: 1233-1234 (1962).

(22) FLIEDNER,T.M.,CRONKITE,E.P.,and BOND,V.P. Die Proliferationsdynamik der Blutzellbildung,autoradiographisch untersucht mit Tritium - markiertem Thymidin.
Schweiz.med.Wschr. 89: 1061-1066 (1959).

(23) FOUNTAIN,J.R.,WARING,G.B.,and BURCHENAL,J.R. Distribution of Amethopterin in Normal Mouse Tissues Following Intravenous Injection.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 81: 193-196 (1952).

(24) FOUNTAIN,J.R.,HUTCHISON,D.J.,WARING,G.B.,and BURCHENAL,J.H. Persistance of Amethopterin in Normal Mouse Tissues.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 83: 369-373 (1953).

(25) FREEMAN,M.V. Fluorometric Method for the Measurement of 4-Amino-10-methyl Pteroylglutamic Acid (Amethopterin) in Plasma.
J.Pharmacol. 120: 1-8 (1957).

(26) FREEMAN,M.V. Fluorometric Measurement of the Absorbtion,Distribution and Excretion of Single Doses of 4-Amino-10-methyl Pteroylglutamic Acid (Amethopterin) in Man.
J.Pharmacol. 122: 154-162 (1958).

(27) FRIEDKIN,M. The Transfer of H^3 from Tritiated Tetrahydrofolic Acid to Thymidylic Acid.
Fed.Proc. 18: 230 (1959).

(28) FUTTERMAN,S. Enzymatic Reduction of Folic Acid and Dihydrofolic Acid to Tetrahydrofolic Acid.
J.Biol.Chem. 228: 1031-1038 (1957).

(29) GAVOSTO,E.,MARINARI,G.,and PILERI,A. Nucleic Acids in Protein Metabolism in Acute Leukemic Cells.
Blood 16: 1555-1563 (1960).

(30) GOLDIN,A.,VENDITTI,J.M.,HUMPHREYS,S.R.,DENNIS,D.,MANTEL,N.,and GREENHOUSE,S.W. A Quantitative Comparison of the Antileukemic Effectiveness of Two Folic Acid An-

tagonists in Mice.
J.Natl.Cancer Inst. 15: 1657-1664 (1955).

(31) GROSS,R.,GRUNDMANN,E.,BREHMKE,H.,KAHLSDORF,J. und BOCK,U. Art und Intensität der Zellvermehrung bei akuten Leukosen.
Klin.Wschr. 392-4oo (1962).

(32) HAKALA,M.T.,ZAKRZEWSKI,S.F.,and NICHOL,C.A. Relation of Folic Acid Reductase to Amethopterin Resistance of Cultured Mammalian Cells.
J.Biol.Chem. 236: 952-958 (1961).

(33) HAKALA,M.T. Induction of Folic Acid Reductase and Drug Penetration in Amethopterin Resistance of Cultured Mammalian Cells.
Fed.Proc. 21: 236 (1962).

(34) HOLLAND,J.F. Symposium on the Experimental Pharmacology and Clinical Use of Antimetabolites,Part VIII.Folic Acid Antagonists.
Clin.Pharmacol.Therap. 2: 374-4o9 (1961).

(35) HUENNEKENS,F.M.,and OSBORN. Folic Acid Coenzymes and One-carbon Metabolism.
Adv.Enzymol. 21: 369-444 (1959).

(36) HUENNEKENS,F.M. The Role of Dihydrofolic Reductase in the Metabolism of One-carbon Units.
Biochemistry 2: 151-161 (1963).

(37) JACOBSON,W. Methotrexate Symposion 1964,London.

(38) JAENICKE,L. und WILMANNS,W. Der Stoffwechsel der Folsäure und der Einkohlenstoffeinheiten.
Klin.Wschr. 41: 1o29-1o38 (1963).

(39) JOHNS,D.G.,HOLLINGWORTH,J.W.,CASHMORE,A.R.,PLENDERLEITH,I.H., and BERTINO,J.R. Methotrexate Displacement in Man.
J.Clin.Invest. 43: 621-629 (1964).

(4o) LAW,L.W.,and BOYLE,P.J. Development of Resistance to Folic Acid Antagonists in a Transplantable Leukemia.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 74: 599-6o2 (195o).

(41) McDOUGALL,B.M.,and BLAKLEY,R.L. The Biosynthesis of Thymidylic Acid.I.Preliminary Studies with Extracts of

Streptococcus faecalis.
J.Biol.Chem. 236: 832-837 (1961).

(42) MISRA,D.K.,HUMPHREYS,S.P.,FRIEDKIN,M.,GOLDIN,A.,and CRAWFORD,E.J. Increased Dihydrofolate Reductase Activity as a Possible Basis of Drug Resistance in Leukemia. Nature 189: 39-42 (1961).

(43) MÜLLER,D. Desoxyribonukleinsäurebestimmungen in den Leukocyten der normalen und leukämischen Granulopoese. Klin.Wschr. 42: 22-31 (1964).

(44) NICHOL,C.A. Studies on the Mechanism of Resistance to Folic Acid Antagonists in a Strain of Streptococcus faecalis.
J.Biol.Chem. 207: 725-732 (1954).

(45) NICHOL,C.A. Studies on the Mechanism of Resistance to Folic Acid Antagonists by Leukemic Cells.
Cancer Res. 14: 522-526 (1954).

(46) NICHOL,C.A.,ZAKRZEWSKI,S.F.,and WELCH,A.D. Resistance to Folic Acid Analogues in a Strain of Streptococcus faecalis.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 83: 272 (1956).

(47) NICHOL,C.A. Studies on Resistance to Folic Acid Antagonists.In J.W.Rebuck,F.H.Bethell,and R.W.Monto (eds.) The Leukemias:Etiology,Pathophysiology and Treatment,pp.583-604.New York:Academic Press;Inc.,1957.

(48) O'BRIEN,J.S. The Role of the Folate Coenzymes in Cellular Division a Review.
Cancer Res. 22: 267-281 (1962).

(49) PETERS,J.M.,and GREENBERG,D.M. Studies on Folic Acid Reduction. Biochim.Biophys.Acta 32: 273-274 (1959).

(50) RABINOWITZ,J.C. Folic Acid.In P.O.Boyer,H.A.Lardi,and K.Myrbaek.The Enzymes.Vol.II,pp.185-253.New York: Academic Press 1960.

(51) SAMPEY,J.R. Limitations in the Chemical Treatment of Acute Leukemia.
Am.J.Pharmacol. 130: 200-206 (1958).

(52) SARTORELLI,A.C.,and LE PAGE,G.A. Effects of Amethopterin on the Purine Biosynthesis of Susceptible and Resistant

TA 3 Ascites Cells.
Cancer Res. 18: 1336-1339 (1958).

(53) SILBER,R.,HUENNEKENS,F.M.,and GABRIO,B.W. Dihydrofolic Reductase and Thymidylate Synthetase in the Leukocyte.
Fed.Proc. 21: 241 (1962).

(54) SKIPPER,H.E.,BENNETT,L.L.,Jr.,and LAW,L.W. Effects of Amethopterin on Formate Incorporation into the Nucleic Acids of Susceptible and Resistant Leukemic Cells.
Cancer Res. 12: 677-679 (1952).

(55) SMELLIE,R.M.S.,KEIR,H.M.,and DAVIDSON,J.N. Studies on the Biosynthesis of Deoxyribonucleic Acid by Extracts of Mammalian Cells.I.Incorporation of (H^3)Thymidine.
Biochim.Biophys.Acta 35: 389-404 (1959).

(56) STOKSTAD,E.L.R. In:W.H.Sebrell,Jr.,and Harris,R.S.(eds.),The Vitamins,Vol.III,pp.87-199.New York:Academic Press,Inc.,1954.

(57) TOTTER,J.R.,and BEST,A.N. The Metabolism of Formate-C^{14} by Rabbit Bone Marrow in Vitro.
Arch.Biochem.Biophys. 54: 318-328 (1955).

(58) WELCH,A.D. The Problem of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy.
Cancer Res. 19: 359-371 (1959).

(59) WELLS,W.,and WINZLER,R.J. Metabolism of Human Leukocytes in Vitro.III.Incorporation of Formate-C^{14} into Cellular Components of Leukemic Human Leukocytes.
Cancer Res. 19: 1086-1090 (1959).

(60) WERKHEISER,W.C. Specific Binding of 4-Amino Folic Acid Analogues by Folic Acid Reductase.
J.Biol.Chem. 236: 888-893 (1961).

(61) WERKHEISER,W.C.,and HOLLAND,J.R. Pharmacologic Studies of Methotrexate (MTX) and 3',5'-Dichloromethotrexate (DCM) in Man.
Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 3: 256 (1961).

(62) WERKHEISER,W.C.,ZAKRZEWSKI,S.F.,and NICHOL,C.A. Assay for 4-Amino

Folic Acid Analogues by Inhibition of Folic Acid Reductase.
J.Pharmacol. 317: 162-167 (1962).

(63) WERKHEISER,W.C. The Biochemical,Cellular,and Pharmacological Action and Effects of the Folic Acid Antagonists. Cancer Res. 23: 1277-1285 (1963).

(64) WILMANNS,W. Die tetrahydrofolsäure - abhängige Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten in normalen und pathologischen weissen Blutzellen.
Klin.Wschr. 39: 884-888 (1961).

(65) WILMANNS,W. Bestimmung,Eigenschaften und Bedeutung der Dihydrofolsäure-Reduktase in den weissen Blutzellen bei Leukämien.
Klin.Wschr. 4o: 533-54o (1962).

(66) WILMANNS,W. und JAENICKE,L. Die Bedeutung des Folsäurestoffwechsels für die normale und pathologische Reifung von Blutzellen.
Klin.Wschr.41: 1o77-1o82 (1963).

(67) WILMANNS,W. Zum Wirkungsmechanismus von Folsäure - und Purinantagonisten bei der Behandlung akuter Leukämien.
Fol.haematol."Neue Folge"8: 118-128 (1963).

(68) WILMANNS,W. Der Stoffwechsel der Einkohlenstoffeinheiten in den unreifen Vorstufen normaler Leukozyten.
Med.Welt 2667-267o (1963).

(69) WILMANNS,W. 9.Intern.Kong.f.Haemat.,Mexico City 1962.

(7o) WILMANNS,W. Persönliche Mitteilung.

(71) WINZLER,R.J. Anticancer Agents and Nucleic Acid Metabolism of Isolated Human Leukocytes.In: J.W.Rebuck,F.H. Bethell,and R.W.Monto (eds.)The Leukemias:Etiology,Pathophysiology and Treatment,pp.567-581. New York:Academic Press,Inc. 1957.

(72) WOOD,R.C.,FERONE,R.,and HITCHINGS,G.H. The Relationship of Cellular Permeability to the Degree of Inhibition by Amethopterin and Pyrimethamine in Several Specie of Bacteria.
Biochem.Pharmacol. 6: 113-124 (1961).

(73) ZAKRZEWSKI,S.F. Purification and Properties of Folic Acid Reduc-

tase from Chicken Liver.
J.Biol.Chem. 235: 1776-1779 (1960).

(74) ZAKRZEWSKI,S.F. The Mechanism of Binding of Folate Analogues by Folate Reductase.
J.Biol.Chem. 238: 1485-1490 (1963).

L E B E N S L A U F

Am 1.Dezember 1940 wurde ich, Horst Martin, als Sohn des Kaufmanns Werner Martin und dessen Ehefrau Maria Martin, geborene Seitz, in Frickenhausen geboren.

Ab 1951 besuchte ich das Gymnasium in Nürtingen. Ich wählte die mathematisch-naturwissenschaftliche Fachrichtung und legte im Frühjahr 1960 das Abitur ab.

Nach der Ableistung des sechswöchigen Krankenpflegedienstes im Kreiskrankenhaus Kirchheim/Teck begann ich im SS 1960 das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Hier legte ich nach dem WS 1960/61 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach weiteren 3 Semestern die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Frühjahr 1964 begann ich eine experimentelle Dissertationsarbeit an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen (Direktor: Prof.Dr.med.H.E.Bock) bei Herrn Dr. med. W.Wilmanns, für dessen Unterstützung und Anregungen ich sehr zu Dank verpflichtet bin.

Med. Staatsexamen im Januar 1966 in Tübingen beendet.

Horst Martin

BUCH- UND FOTODRUCK
LUDWIG MÖLLER
ERLANGEN · FAHRSTR. 5